

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Die WIRKUNG von ZYTOSIN - ARABINOSID auf die PROLIFERATION von MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Mieske
aus Berlin

1973
—

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Die WIRKUNG von ZYTOSIN - ARABINOSID auf die PROLIFERATION von MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Mieske
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Gerhartz



Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7.9.1973

Gewidmet
meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	7
Ergebnisse	15
Zusammenstellung der Ergebnisse	40
Diskussion	55
Zusammenfassung	59
Literaturverzeichnis	60

Einleitung:

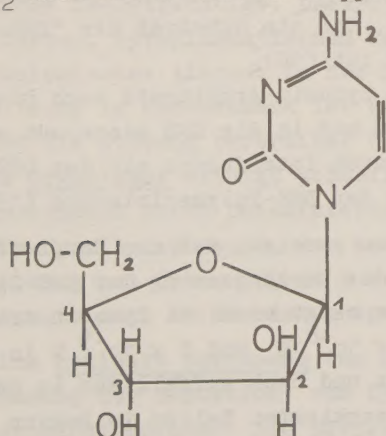
Zytosin-Arabinosid (Alexan^R) wurde 1951 erstmals synthetisiert. Bis dahin war es aus Meeresschwämmen extrahiert worden (3).

1961 wurde es von EVANS als tumorhemmende Substanz bei der Mäuseleukämie L - 1210, dem Ehrlich-Ca und anderen Mäusetumoren beschrieben (31) und 1962 in vitro als Antimetabolit auf seine antiviralen und antitumeralen Eigenschaften getestet (3).

Von TALLEY und VAITKEVICIUS stammt einer der ersten Berichte über die tumorhemmende Wirkung beim Menschen (24). Sie behandelten 13 Patienten, die an Lymphosarkom oder fortgeschrittenem Carcinom erkrankt waren. Dabei stellten sie im Knochenmark aller Patienten megaloblastäre Veränderungen und Abnormitäten in den Mitosen fest. WILMANNS et al. wiesen eine therapeutisch günstige Wirkung auf Lymphosarkome nach (27).

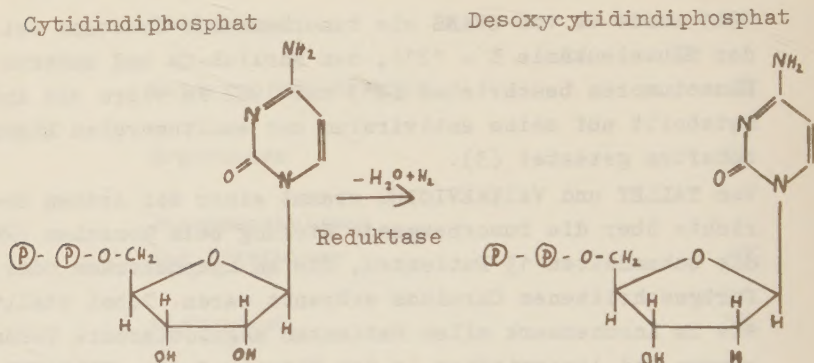
Die Strukturformel von Zytosin-Arabinosid setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: der Base Cytosin und dem Zucker Arabinose.

Im Gegensatz zum Cytidin sind bei Zytosin-Arabinosid am C₂-Atom die H- und OH-Gruppe miteinander vertauscht:



Zytosin-Arabinosid
(= 1- β -D-Arabinosyl-Cytosin)

Sein Wirkungsmechanismus wird erklärt mit der Hemmung der DNS-Synthese (19, 27). Es konkurriert mit dem Cytidindiphosphat, das physiologisch durch Reduktion am C₂-Atom des Riboseanteiles zum Desoxycytidindiphosphat umgewandelt wird (33):



Das in cis zum C₃-Hydroxyl sitzende H-Atom im Ribose- bzw. Arabinose-Molekül ist wahrscheinlich das Erkennungsmerkmal für Enzyme, die die Ribose zur Desoxyribose reduzieren (Reduktase). Wahrscheinlich blockiert die am C₂-Atom befindliche OH-Gruppe des Arabinose-Moleküles die Reduktase - vielleicht durch Ausbildung einer H-Brücke unmittelbar an das aktive Zentrum (33). Dadurch wird die Bildung von Desoxycytidintriphosphat gehemmt, das ein Substrat der "DNS-abhängigen-RNS-Polymerase" ist (16).

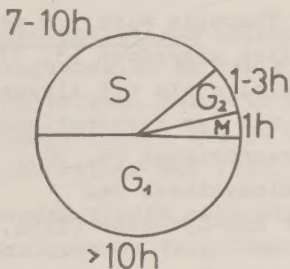
SILAGI vermutet sogar, daß Zytosin-Arabinosid auch bis zum Triphosphat phosphoryliert und in die DNS eingebaut werden kann (27). Das führt durch Interferenz mit der DNS-Polymerase zur Blockierung der DNS-Polymerisierung (19, 22).

Zellkinetische Studien haben gezeigt, daß der Haupteffekt von Zytosin-Arabinosid in der Verlangsamung der DNS-Synthese (S-Periode) besteht. Das zeigt sich bei Zytosin-Arabinosid-Konzentrationen von 5×10^{-8} M und 5×10^{-9} M in der Reduzierung des Mitoseindex und noch auffälliger in der Anhäufung von H³-Thymidin-markierten Zellen im Beginn der

S-Periode nach 24std. Einwirkung. Denn die Zellen, die in die S-Phase eintreten wollen, werden gehemmt und zu Beginn dieser Phase angehäuft. Der einerseits weitergehende Eintritt in die S-Periode und das andererseits reduzierte Passieren derselben führt zum prozentualen Anstieg der markierten Zellen (7).

Beim Nachlassen der Wirkung von Zytosin-Arabinosid nimmt die Mitoseaktivität bis zu 300 % des Kontrollwertes signifikant zu, die dann nach dem Höhepunkt unter den normalen Wert sinkt (17).

Generationszyklus der Zelle:



M = Mitose

G₁ = postmitotische Phase
von variabler Dauer

S = DNS-Synthesephase

G₂ = rel.kurze prämitotische
Phase, in der sich die
Zellen auf die Teilung
vorbereiten

RNS- und Proteinsynthese gehen in den durch Zytosin-Arabinosid gehemmten Zellen weiter, die mRNA ist also nicht beeinträchtigt. Dadurch kommt es zu einem unbalancierten, zytoplasmatischen Wachstum (15, 19), dessen morphologisches Äquivalent in der Erythropoese die Megaloblastenbildung im Knochenmark ist (25). Nach Absetzen der Substanz ist die Störung reversibel (31).

Im Organismus erfolgt schnelle Inaktivierung von Zytosin-Arabinosid durch Desaminierung und Ausscheidung im Urin als Uracilarabinosid, das keine besondere zytostatische Wirkung hat (31). 89-94 % der injizierten Substanz sind bereits nach 24 Stunden ausgeschieden (27).

Eine optimale Dosierung von Zytosin-Arabinosid bewirkt eine Hemmung der Reduktion vom Cytidindiphosphat zum Desoxycytidindiphosphat. Die bisherige Dosierungsempfehlung liegt zwischen 1 mg und 15 mg/kg KG/ die, in der niedrigen Dosierung als Dauertropfinfusion, in der höheren

jeweils als Einzelstoß. Die Dauertropfinfusionen sind riskant, weil bei wirksamer Dosis alle teilungsfähigen Zellen geschädigt werden müssen, was zu unerwünschten zytotoxischen Nebeneffekten führen kann. Die hochdosierte einmalige Applikation ist weniger sinnvoll, da zu wenige Zellen sich zum Zeitpunkt der Injektion in der "vulnerablen" Phase (S-Periode) befinden und wegen der schnellen Desaminierung keine ausreichende Wirkung auf die Gesamtzellpopulation erzielt werden kann (27).

GERHARTZ empfiehlt daher, 3 mg/kg KG/die Alexan^R in 2 Dosen à 1,5 mg/kg für 5 Tage zu verabreichen.

Auch intramuskuläre (9, 32) und perorale Applikationen (8, 23, 32) werden beschrieben.

Die Dauer und Durchführung der Therapie wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben (3, 11 - 14, 20, 23, 31, 32). Bessere Erfolge als mit Alexan^R allein werden verschiedentlich mit der Kombinationstherapie von Alexan^R/6-Azauridin beschrieben (9, 15). 6-Azauridin ist Inhibitor der Biosynthese des Uridin-5-monophosphates und der RNS-Synthese (KARA, WAELSCH).

Bisher wurde Alexan^R u.a. vor allem bei den verschiedenen Formen der akuten Leukämien erfolgreich angewandt (3, 13, 14, 18, 23, 25 - 27, 31), - nach GERHARTZ auch bei akuten Myeloblastenschüben im Verlauf von chronischen Leukämien.

Insbesondere wird der schnelle Remissionseintritt bei Anwendung von Zytosin-Arabinosid positiv beurteilt (27).

Weiter wurde es mit Erfolg bei Erythroleukämien (14, 31) und Polycythämia vera (12, 31, 32) therapeutisch verwendet.

Die Nebenwirkungen sind hauptsächlich Folge der Hemmung der Hämopoese: makrozytäre Anämie, Thrombopenie (10) und Granulopenie (31). Letztere sind im allgemeinen schnell reversibel, während die Erythropoese durch die megaloblastäre Umwandlung besonders geschädigt ist (31).

Klinisch äußern sich die Nebenwirkungen sehr häufig in Übelkeit und Erbrechen. Es kann auch ohne stärkere Thrombopenie eine hämorrhagische Diathese durch gefäß-toxische Wirkung entstehen (31), die manchmal zu Hä-maturie, Zahnfleischbluten, eventuell auch zu Gehirn-blutungen Anlaß gibt (23).

Zytomorphologisch zeigen sich 1 bis 4 Wochen nach Therapiebeginn an den Erythroblasten Kernknospungen, Kernpyknosen, Vakuolisierung und Kernabsprengungen. Mitosestörungen und 2- bis 4-kernige Erythroblasten fallen weiter auf (23).

Außerdem findet sich eine toxische Beeinflussung der Granulopoese: Vergrößerung der unreifen Zellen, Kernabsprengungen, Vakuolisierung im Protoplasma und im Kern, Mitosen mit Chromatinverklumpung und in den Stammzellen eine leicht verwaschene Chromatinstruktur. Ein Hinweis auf die erhöhte Zellfragilität sind gehäuft auftretende Kernschatten und zerfallene Zellen in den Ausstrichen (29).

Ziel dieser Arbeit ist es, den direkten Einfluß von Zytosin-Arabinosid auf die Proliferation menschlicher Knochenmarkzellen in vitro zu untersuchen. Hierbei ist es möglich, die unmittelbare Wirkung des Zytostatikums auf die Zellen qualitativ und quantitativ zu erfassen.

Weiterhin soll untersucht werden, ob leukämisches und nicht-leukämisches Knochenmark unterschiedlich durch Zytosin-Arabinosid beeinflusst werden.

Material und Methode:

Das Knochenmark wurde durch Sternalpunktion gewonnen. Die Herstellung der Kulturen erfolgte nach der Carrel-schen Methode mit Modifikation nach BOLL (4).

Aus einer Mischung, die sich zu 10 % aus dem Wachstoffs Corhormon^R, zu 40 % aus Serum und zu 50 % aus dem Nativ-plasma des Patienten zusammensetzt, wird jeweils ein Tropfen auf einen Objektträger gebracht, nach dem Koagulieren mit einem Bröckel Knochenmark versehen und mit Serum überschichtet. Die Knochenmark-Kultur wird als hängender Tropfen über dem hohlgeschliffenen Objektträger mit Paraffin verschlossen und in einem Brutschrank bei 37 °C bebrütet.

Die Konzentration des beigemengten Zytostatikums betrug 20 µg/ml und entsprach damit ungefähr den in der Literatur angegebenen, als optimal eruierten Konzentrationen von ca. 3 mg/kg KG/die bei den durch i.v. Applikation behandelten Patienten. Z.Zt. gibt es noch keine Untersuchungen über den therapeutisch wirksamen Zytosin-Arabinosid-Blutspiegel. Die Kulturen waren zum Teil mit und zur Kontrolle ohne Zusatz von Zytosin-Arabinosid angesetzt.

Das Knochenmark von 5 Patienten wurde untersucht.

Vom Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5 wurden die Kulturen jeweils 24, 48 und 72 Stunden bebrütet, vom 4. Patienten bis zu 96 Stunden. Nach diesen Bebrütungszeiten wurden Ausstriche angefertigt, an der Luft getrocknet und mit Lösungen nach May-Grünwald und Giemsa gefärbt (21). Dazu wurde von jedem Patienten aus dem Knochenmark-Punktionsmaterial ein Originalausstrich hergestellt. Insgesamt wurden also pro Patient 7 Präparate bzw. bei einem Patienten 9 Präparate gezählt.

Die Auswertung der Ausstriche erfolgte in mäanderförmiger Zählweise, wobei pro Präparat möglichst 2000 Zellen gezählt wurden.

Die Gesamtzahl der zur Auswertung gebrachten Zellen betrug 73 688.

Es wurde dabei nach den von BOLL (4) und BOLL und MERSCH (6) angegebenen Kriterien differenziert (in Klammern die in den Tabellen und Abbildungen verwendeten Abkürzungen):

Erythropoese:

- | | |
|-----------------------------------|------|
| 1. Proerythroblast | (Pb) |
| 2. basophiler Erythroblast | (bE) |
| 3. polychromatischer Erythroblast | (pE) |
| 4. oxyphiler Erythroblast | (oE) |
| 5. reifer Erythroblast | (rE) |

Als teilungsfähig wurden die Zellen 1 - 4 angesehen.

Granulopoese:

- | | |
|--|-------|
| 1. Myeloblast | (Mb) |
| 2. Promyelozyt | (P) |
| 3. neutrophiler Myelozyt | (nM) |
| 4. eosinophiler Myelozyt | (eM) |
| 5. basophiler Myelozyt | (bM) |
| 6. Promonozyt | (Mob) |
| 7. Metamyelozyt | (MM) |
| 8. stabkerniger Granulozyt | (St) |
| 9. neutrophiler segment-
kerniger Granulozyt | (nS) |
| 10. eosinophiler segment-
kerniger Granulozyt | (eS) |
| 11. basophiler segment-
kerniger Granulozyt | (bS) |
| 12. Monozyt | (Moz) |

Als teilungsfähig wurden die Zellen 1 - 7 angesehen.

Weitere in den Tabellen verwendete Abkürzungen:

K = Kontrolle; Z = Zusatz von Zytosin-Arabinosid.

Außerdem wurden folgende Zellen gezählt:

- große Retikulumzellen
- kleine Retikulumzellen
- phagozytierende Retikulumzellen
- Plasmoblasten
- Plasmazellen
- Megakaryoblasten
- Megakaryozyten
- Lymphozyten.

Die Einteilung der Mitosephasen erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten (4):

1. Prophase:

Auflösung der Kernmembran, keine Nucleoli,
festes Spirem

2. Frühe Metaphase:

Verteilung der Chromosomen über die gesamte
Zelle, lockeres Spirem

3. Späte Metaphase:

Monaster, Äquatorialplatte

4. Anaphase:

Diaster

5. Telophase:

Einschnürung des Zellplasmas,
lockeres Dispirem

6. Rekonstruktionsphase:

Zwei Zellen mit festem Dispirem, manchmal
fadenförmige Verbindung zwischen beiden
Zellen.

Als Zeichen der Kerndegeneration galten:

1. Pyknose

2. Homogenisierung

3. Kernlyse = Auflockerung

4. Karyorrhexis = Kernzerfall (mit vorangehender Kern-
lappung =
"Gänseblümchen"-Kerne)

Die Proliferationsaktivität menschlicher Knochenmarkszellen *in vitro* während 3 Tagen wurde anhand von Reifungskurven, G/E-Indices, Mitose-Indices und karyologischen Kurven ausgewertet:

1. Reifungskurve:

zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Reifungsstufen der Erythro- bzw. Granulopoese auf der Abszisse (additiv aufgetragen) zu den jeweiligen Ausstrichzeiten auf der Ordinate (nach 24, 48, 72 und evtl. 96 Stunden).

2. G/E-Index:

als absolute Zahl angegeben, errechnet sich als Quotient aus der Gesamtzahl der granulopoetischen Zellen und der Gesamtzahl der erythroetischen Zellen, gibt also das Verhältnis von Granulopoese zu Erythropoese an und zeigt damit bei Anstieg eine stärkere Depression der roten Reihe und bei Abfall eine stärkere Depression der weißen Reihe.

3. Mitoseindex der Erythropoese (roter Mitoseindex = rMI) bzw. Granulopoese (weißer Mitoseindex = wMI): in % angegeben, errechnet sich aus dem Quotienten der sich teilenden Zellen und der teilungsfähigen Zellen der roten bzw. weißen Reihe und gibt Auskunft über die Teilungshäufigkeit der roten bzw. weißen Zellen.

4. Karyologische Kurve:

zeigt die absolute Verteilung der einzelnen Mitosephasen (Abszisse = Mitosephasen, Ordinate = Mitosezahlen).

5. Die Signifikanzberechnung soll zeigen, ob die Versuchsergebnisse signifikant sind.

Dazu muß in diesem Fall die Nullhypothese mit der größtmöglichen Wahrscheinlichkeit widerlegt werden. Diese Hypothese besagt, daß die Differenzen zwischen zwei Stichproben A und B gleich Null sind bzw. sich zwei Stichproben wahrscheinlich nicht unterscheiden. Hierbei wird untersucht, ob die jeweiligen Stichproben aus Zusatz und Kontrolle wesentlich (d.h. signifikant bzw. hoch-signifikant) oder unwesentlich (d.h. nicht signifikant) differieren.

Der Widerlegung der Nullhypothese liegt bei dieser Berechnung das χ^2 -Verfahren zugrunde, da die Beobachtungsreihen eine stetige Normalverteilung aufweisen.

Die Methode geht von einem Vergleich zwischen einer Reihe mit theoretischen Werten (Erwartungswerten) und einer Reihe mit Beobachtungswerten aus (1).

Die Signifikanzberechnung wurde nur bei dem Fall durchgeführt, bei dem aus dem Bild der prozentualen Reifungskurven mit der geringsten Wahrscheinlichkeit ein signifikanter Unterschied zu erwarten war.

Die Wahrscheinlichkeit wird für Werte zwischen 1 % (d.h. signifikant) und 1‰ (d.h. hochsignifikant) aus Tabellen abgelesen (2).

Die Formel für die Berechnung der χ^2 -Werte lautet:

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(B_K - E_K)^2}{E_K} \right] + \sum \left[\frac{(B_Z - E_Z)^2}{E_Z} \right]$$

Σ sind die Summen der einzelnen innerhalb der Klammern errechneten Werte. B_K ist der Beobachtungswert der Kontrollgruppe, E_K ist der Erwartungswert der Kontrollgruppe und in den mit Zytosin-Arabinosid behandelten Gruppen ist B_Z = Beobachtungswert der Zusatzgruppe und E_Z = Erwartungswert der Zusatzgruppe.

Am Beispiel des Falles B., Elise (24-Stunden-Kultur, Kontrolle (K) bzw. Zusatz (Z), Erythropoese) soll anhand der ermittelten Originalwerte die Berechnung erläutert werden:

	K	Z
Pb	23	11
bE	61	25
pE	296	225
oE	26	15
rE	<u>539</u>	<u>427</u>
	945	703

Die beiden Stichproben wurden vereinigt:

Pb	23	+	11	=	34
bE	61	+	25	=	86
pE	296	+	225	=	521
oE	26	+	15	=	41
rE	539	+	427	=	<u>966</u>
			n	=	1648

n ist die Summe der vereinigten Stichproben. Daraus wurden die Prozentwerte bzw. relativen Häufigkeiten gebildet (34 = 2,06 % von 1648):

34	=	0,0206 (Pb)
86	=	0,0522 (bE)
521	=	0,3161 (pE)
41	=	0,0249 (oE)
<u>966</u>	=	<u>0,5862 (rE)</u>
1648		1,0000

Die Erwartungswerte für die Kontroll- und die Zusatzgruppe ergaben sich aus dem Produkt der rel. Häufigkeit mit dem jeweiligen Beobachtungswert der Kontroll- bzw. Zusatzgruppe. E von $Pb_K = 0,0206 \times 945$ (Summe der Kontrollgruppe) = 19,47.

Daraus folgt:

E_K	E_Z
19,47	14,48
49,33	36,70
298,71	222,22
23,53	17,50
<u>553,96</u>	<u>412,10</u>
945,00	703,00

Nach der Formel $(B - E)^2/E$ werden die jeweiligen Werte für die Kontroll- bzw. Zusatzgruppe errechnet, z.B.

$Pb_K = (23 - 19,47)^2/19,47 = 0,64$. Daraus, die Summen der jeweiligen Reihen der K- und Z-Gruppe addiert, ergaben sich die Werte für χ^2 :

K	Z
0,64	0,84
2,76	3,73
0,02	0,03
0,26	0,36
<u>0,40</u>	<u>0,54</u>
4,08	5,50
+	
	9,58 = χ^2

Aus χ^2 -Sicherheitspunkttabellen läßt sich mit Hilfe des χ^2 -Wertes und des entsprechenden Freiheitsgrades entnehmen, mit welcher Wahrscheinlichkeit in einem entsprechenden Fall ein gleich großes oder größeres χ^2 zu erwarten ist (28).

Bei - wie in diesem Fall - 5 Merkmalsklassen ist durch die Häufigkeiten von 4 Klassen die Häufigkeit der 5. Klasse festgelegt (1).

Unter "Freiheitsgrad" ist die um 1 verminderte Anzahl der Merkmalsklassen zu verstehen (2).

Diese Form der Berechnung darf nur dann durchgeführt werden, wenn die Erwartungswerte größer als 5 sind.

Anderenfalls muß eine Korrektur mit dem Yate'schen Korrekturfaktor durchgeführt werden. Das bedeutet, daß jeder Beobachtungswert, der größer als der Erwartungswert ist, um 0,5 erniedrigt wird und jeder Beobachtungswert, der kleiner als der Erwartungswert ist, um 0,5 erhöht wird. (Dabei bleiben die Randsummen unverändert.)

Ergebnisse:

Die Wirkung von Zytosin-Arabinosid auf die Proliferation der Knochenmarkszellen wurde an den Kulturpräparaten folgender 5 Patienten untersucht:

Fall I:

Patient: G., Dieter geb. am 12.10.30

Diagnose: Verdacht auf Herzinfarkt

Therapie: 1 Woche vor der KM-Punktion:

Herzglykoside

Sedativa

Lasix^R

Blutbild am 8.4.70:

Erythrozyten	5,14 Mill./mm ³
Hb	17,0 g%
HbE	32,9 pg
Lymphozyten	7 100/mm ³
Thrombozyten	136 000/mm ³

Differential-Blutbild:

Stabkernige Granulozyten	2 %
Segmentkernige Granulozyten	61 %
Eosinophile Granulozyten	4 %
Monozyten	5 %
Lymphozyten	28 %

- - - - -

Fall II:

Patient: K., Julius geb. am 25.2.99

Diagnose: inoperables, metastasierendes Bronchial-Ca

Therapie: 19.3.70 200 mg Endoxan^R

20.3.70 " " "

21.3.70 " " "

Blutbild am 24.3.70:

Erythrozyten	4,18 Mill./mm ³
Hb	13,9 g%
HbE	32,9 pg

Leukozyten	8 700/mm ³
Thrombozyten	110 000/mm ³

Differential-Blutbild:

Metamyelozyten	1 %
Stabkernige Granulozyten	6 %
Segmentkernige Granulozyten	80 %
Monozyten	1 %
Lymphozyten	12 %
Anisozytose	+
Polychromasie	(+)

Exitus letalis im akuten Herz-Kreislaufversagen am
26.3.70.

- - - - -

Fall III:

Patientin: H., Marie geb. am 2.5.99

Diagnose: Kardiogener Schock bei Hinterwandschwiele,
Anämie (7.3.70), Bronchopneumonie

Therapie: seit 1 Woche vor der KM-Funktion:

1 x 1 Kaps. Furosemid ret.^R/die

Blutbild am 9.4.70:

Erythrozyten	4,10 Mill./mm ³
Hb	12,2 g%
HbE	29,8 pg
Leukozyten	6 600/mm ³
Thrombozyten	210 000/mm ³

Differential-Blutbild:

Stabkernige Granulozyten	1 %
Segmentkernige Granulozyten	66 %
Eosinophile Granulozyten	2 %
Monozyten	5 %
Lymphozyten	23 %
Atypische mononukleäre Zellen	3 %
Anisozytose	+

am 25.4.70: Fe i.S. 71 δ %

Fall IV:

Patientin: B., Elise geb. am 28.6.03
Diagnose: serologisch nachgewiesener grippaler Infekt,
Infektanämie

Während des Klinikaufenthaltes:

Cholezystektomie
Pneumonie mit Interlobärerguß
septische Fieberschübe

Behandlung mit

Tetracyclin
Chloramphenicol
Bluttransfusionen (wegen einer Anämie)

Therapie: 1 Woche vor der KM-Punktion:

Herzglykoside
Sedativa
Antikoagulantien
Broncholytika
Vitamin B₁₂

Blutbild am 9.3.70:

Hämatokrit	34 %
Hb	10,3 g%

Differential-Blutbild:

Segmentkernige Granulozyten	72 %
Monozyten	4 %
Lymphozyten	24 %

Blutbild am 12.3.70:

Erythrozyten	4,03 Mill./mm ³
Hb	11,6 g%
Hämatokrit	38 %

am 17.3.70: Fe i.S. 74 %

Differential-Blutbild am 18.3.70:

Stabkernige Granulozyten	12 %
Segmentkernige Granulozyten	65 %
Eosinophile Granulozyten	1 %
Basophile Granulozyten	1 %
Monozyten	3 %
Lymphozyten	18 %

- - - - -

Fall V:

Patientin: N., Hilde geb. am 11.5.08

Diagnose: beginnende chronische myeloische Leukämie

Therapie: noch keine Behandlungsbedürftigkeit

Blutbild am 7.7.70:

Erythrozyten	4,07 Mill./mm ³
Hb	13,0 g%
HbE	31,8 pg
Leukozyten	20 000/mm ³
Thrombozyten	366 000/mm ³

Differential-Blutbild:

Promyelozyten	1 %
Myelozyten	1 %
Stabkernige Granulozyten	6 %
Segmentkernige Granulozyten	79 %
Eosinophile Granulozyten	1 %
Basophile Granulozyten	1 %
Monozyten	2 %
Lymphozyten	9 %

Die alkalische Leukozyten-Phosphatase ist negativ.

Die Kulturpräparate mit Zusatz von Zytosin-Arabinosid zeigten bei den Patienten häufig folgende morphologische Zellveränderungen: in der Erythropoese Megaloblasten, in der Granulopoese Übersegmentierungen und Vakuolisierung (in neutrophilen segmentkernigen Granulozyten), sowie Kernabsprengungen und -ausziehungen.

Die 72-Stunden-Präparate der Zusatzkulturen waren oft wegen der stark zerstörten Zellen schwer zu differenzieren. Dies ist sicherlich auf die pathophysiologische Wirkung von Zytosin-Arabinosid zurückzuführen.

Die Auswertung des Zellmaterials wird nach den oben genannten Kriterien durchgeführt. Dabei werden die Kulturpräparate ohne Zusatz zu denen mit Zusatz von Zytosin-Arabinosid miteinander verglichen.

Die in den Reifungskurven beschriebene Verschiebung der Kurven nach links ist deskriptiv und nicht als "Linksverschiebung" im Sinne ROHRs zu verstehen.

Fall I: normales Knochenmark

Tab. 1, Abb. 1

1. Reifungskurve der Erythropoese:

Nach 24 und 48 Stunden fällt nach Zusatz von Zytosin-Arabinosid eine deutliche Verschiebung der Kurven nach links auf. Das bedeutet eine starke Abnahme der Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten und eine enorme prozentuale Vermehrung der reifen Erythroblasten.

Nach 72 Stunden ist der Wirkungsverlust des Zytostatikums auffällig, was an der starken prozentualen Zunahme der polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten und der deutlichen Abnahme der reifen Erythroblasten zu erkennen ist.

2. Reifungskurve der Granulopoese:

Auch hier zeigt sich nach 24 und 48 Stunden eine bemerkenswerte Verschiebung der Kurven nach links, d.h. eine auffällige Abnahme insbesondere der Promyelozyten und Myelozyten und eine Zunahme vor allem der Segmentkernigen. In der 72-Stunden-Kultur steigt der Prozentsatz der Promyelozyten und Myelozyten stark an und die Segmentkernigen verringern sich.

3. G/E-Indices: (s. Tab. 7, S. 46)

Nach 24 Stunden Einwirkung von Zytosin-Arabinosid zeigt sich keine deutliche Änderung, nach 48 Stunden eine stärkere Depression der Erythropoese und nach 72 Stunden der Granulopoese.

4. Mitosen: (s. Tab. 8, S. 47)

Alle Mitoseindices der roten und weißen Reihe sind unter Einfluß von Zytosin-Arabinosid erhöht.

Tabelle 1 (Pat. G., Dieter)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Pb	2,0	1,2	1,9	1,1	-	-
bE	3,3	2,5	3,2	1,8	2,5	2,4
pE	36,2	13,6	15,4	10,4	4,9	6,4
oE	3,1	1,4	11,8	16,4	5,4	17,4
rE	55,4	81,3	67,7	70,3	87,2	73,8
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

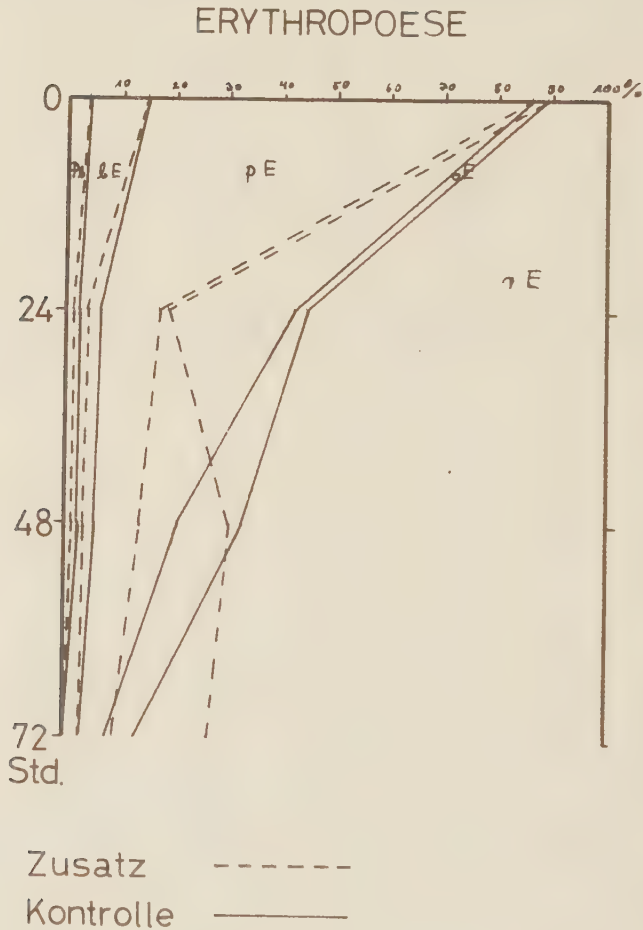
	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
mb	1,7	1,7	1,6	0,7	0,7	-
P	17,8	7,6	6,2	5,4	3,7	9,1
nM	31,0	20,5	14,8	10,6	12,3	18,9
eM	1,8	1,8	1,8	1,6	1,7	6,1
bM	-	0,1	0,1	-	0,2	-
MoB	0,5	0,6	0,7	0,4	0,2	-
MM	24,9	32,1	38,8	28,3	37,6	32,4
St	0,8	2,8	5,6	3,4	3,5	2,3
nS	18,3	28,9	26,7	46,6	32,8	28,1
eS	1,7	3,1	2,0	2,1	5,8	0,8
bS	-	-	0,2	0,1	-	-
MoZ	1,1	0,8	1,1	0,8	1,5	2,3
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Mitosen

	M_K	M_Z		M_K	M_Z
rMI	$\frac{3}{265}$	$\frac{2}{91}$	wMI	$\frac{5}{581}$	$\frac{10}{464}$
24h			48h		
wMI	$\frac{10}{1034}$	$\frac{9}{843}$	rMI	$\frac{1}{26}$	$\frac{2}{33}$
24h			72h		
rMI	$\frac{2}{180}$	$\frac{4}{134}$	wMI	$\frac{1}{303}$	$\frac{2}{176}$
48h			72h		

M_K =Mitosen in Kontrollkultur; M_Z =Mitosen in Zusatzkultur

Abb. 1 a (Reifungskurven, Dieter G.)

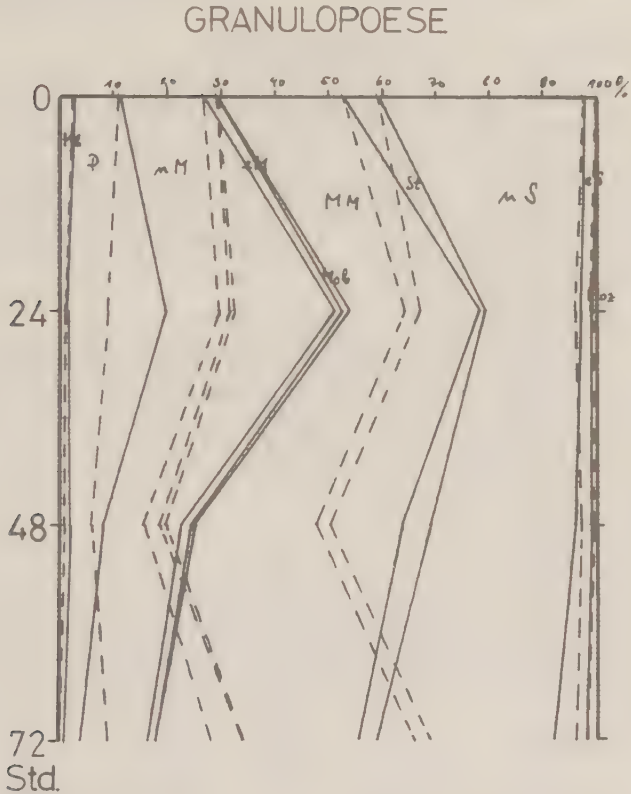


Abszisse: prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Erythropoese, addierend aufgetragen. Dabei beträgt Gesamtzellbestand der Erythropoese = 100 % (planimetrische Darstellung)

Ordinate: Inkubationszeit der Kulturen in Stunden

Zeichenerklärung: siehe Seite 8

Abb. 1 b (Reifungskurven, Dieter G.)



Zusatz -----

Kontrolle —————

Abszisse: prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Granulopoese, addierend aufgetragen. Dabei beträgt Gesamtzellbestand der Granulopoese = 100 % (planimetrische Darstellung)

Ordinate: Inkubationszeit der Kulturen in Stunden

Zeichenerklärung: siehe Seite 8

Fall II: angeregtes Retikulum bei Bronchial-Ca

Tab.2, Abb.2

1. Reifungskurve der Erythropoese:

Nach 24 und 48 Stunden Bebrütung mit Zytosin-Arabinosid nehmen die unreifen Zellen prozentual stark ab und die oxyphilen und reifen Erythroblasten zu. In der 72-Stunden-Kultur ist wieder eine Zunahme der polychromatischen Erythroblasten und eine Abnahme der reifen Erythroblasten zu erkennen.

2. Reifungskurve der Granulopoese:

Die 24- und 48-Stunden-Kulturen zeigen erneut eine deutliche Abnahme der teilungsfähigen Zellen und eine enorme Zunahme der ausgereiften Zellen. Nach 72 Stunden vermehren sich die Myelozyten, die Stab- und Segkernigen nehmen ab.

3. G/E-Indices: (s. Tab. 7, S. 46)

Bei Zusatz von Zytosin-Arabinosid läßt sich nach 24 Stunden kein Unterschied zu den Kontroll-Präparaten, nach 48 Stunden eine Depression der Granulopoese und nach 72 Stunden wieder kein Unterschied erkennen.

4. Mitosen: (s. Tab. 8, S. 47)

Sämtliche Mitoseindices sind durch den Zusatz des Zytostatikums erhöht.

Tabelle 2 (Pat. K., Julius)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Pb	3,7	2,4	2,6	0,7	0,3	0,4
bE	7,2	6,6	4,9	4,9	1,1	0,9
pE	37,3	28,9	21,4	14,3	14,8	32,7
oE	2,8	4,1	3,1	7,1	4,8	10,0
rE	49,0	58,0	68,0	73,0	79,0	56,0
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

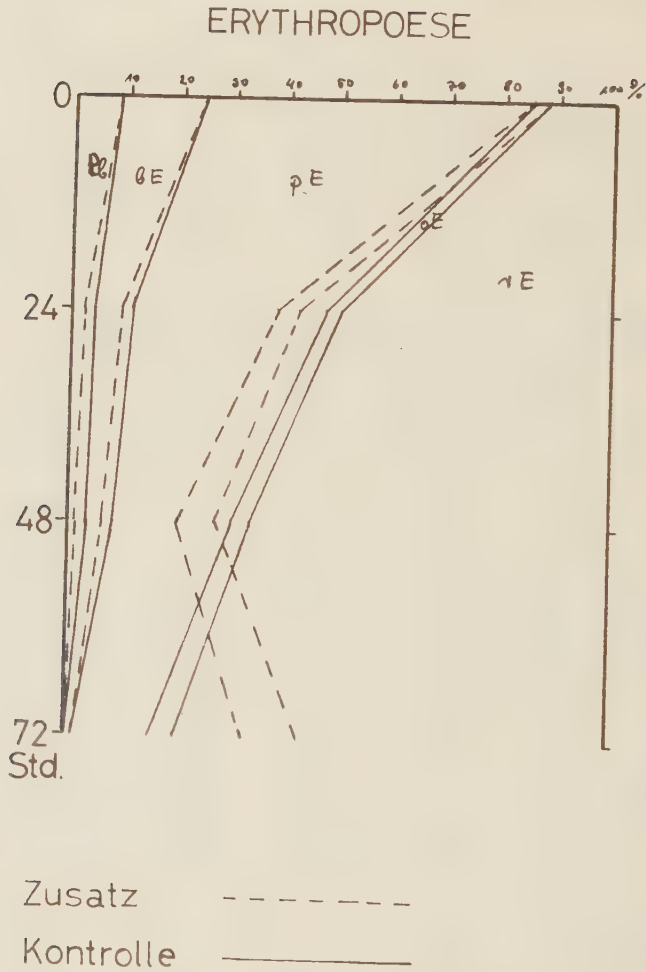
	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Mb	2,7	3,4	2,0	1,4	0,7	1,3
P	37,1	13,3	16,9	3,1	4,6	3,2
nM	33,0	37,9	38,2	21,3	32,2	43,9
eM	2,3	2,7	2,4	1,2	1,8	2,3
bM	0,8	0,7	1,9	0,3	0,7	0,1
Mob	1,1	1,3	0,8	0,6	0,5	0,9
MM	13,5	13,6	18,7	9,7	23,2	22,2
St	4,0	8,0	2,2	14,2	5,8	1,6
nS	4,4	14,9	15,8	46,5	29,0	23,6
eS	0,4	1,0	0,7	0,7	1,1	0,5
bS	0,1	0,2	0,2	-	-	-
Moz	0,6	3,0	0,2	1,0	0,4	0,4
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Mitosen

	M_K	M_Z		M_K	M_Z
rMI	8	9	wMI	6	8
24h	368	343	48h	1035	426
wMI	11	13	rMI	1	3
24h	882	830	72h	261	450
rMI	4	6	wMI	2	4
48h	194	239	72h	483	552

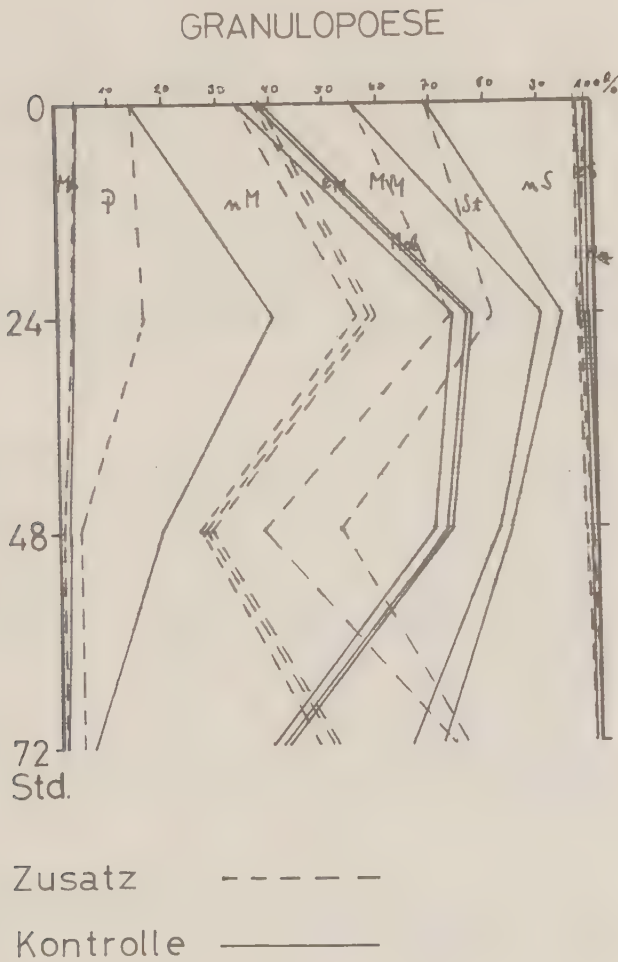
M_K =Mitosen in Kontrollkultur; M_Z =Mitosen in Zusatzkultur

Abb. 2 a (Reifungskurven, Julius K.)



Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

Abb. 2 b (Reifungskurven, Julius K.)



Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

1. Reifungskurve der Erythropoese:

Die 24-Stunden-Kultur verdeutlicht unter Zusatz von Zytosin-Arabinosid eine prozentual stärkere Abnahme der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten und eine relative Vermehrung der polychromatischen, oxyphilen und reifen Erythroblasten. Nach 48 Stunden zeichnen sich eine Abnahme der Proerythroblasten und polychromatischen Erythroblasten und eine Zunahme der oxyphilen und reifen Erythroblasten ab. In der 72-Stunden-Kultur nehmen unter Zusatz die polychromatischen Erythroblasten wieder relativ zu und die reifen Erythroblasten relativ ab - wie in Fall II.

2. Reifungskurve der Granulopoese:

Nach 24 Stunden nimmt lediglich der Prozentsatz der Promyelozyten und der Stabkernigen ab, die Segmentkernigen vermehren sich unter Zusatz des Zytostatikums. Die 48- und 72-Stunden-Kulturen lassen eine deutliche Verminderung der unreifen Zellen und eine enorme Vermehrung der segmentkernigen Granulozyten erkennen.

3. G/E-Indices: (s. Tab. 7, S. 46)

Der G/E-Index zeigt nach 24 und 48 Stunden bei Zugabe von Zytosin-Arabinosid eine stärkere Depression der Erythropoese und nach 72 Stunden der Granulopoese.

4. Mitosen: (s. Tab. 8, S. 47)

Die Mitoseindices steigen unter Zusatz des Zytostatikums, - mit einer Ausnahme: nach 72 Stunden sinkt der Mitoseindex in der Erythropoese.

Tabelle 3 (Pat. H., Marie)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Pb	2,9	0,8	0,3	0,5	-	0,3
bE	7,2	1,2	1,0	1,3	0,2	0,3
pE	12,8	15,2	8,6	6,6	1,8	12,0
oE	2,4	4,3	4,8	6,6	4,0	9,3
rE	74,7	78,5	85,3	85,0	94,0	78,1
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

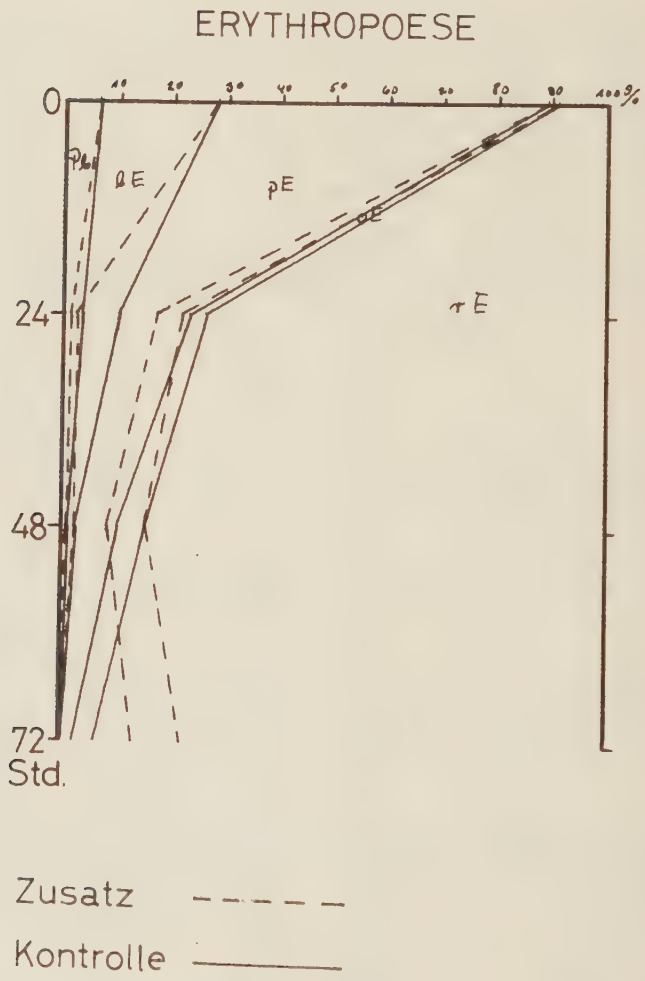
	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Mb	0,7	0,8	0,6	0,3	0,2	0,1
P	16,5	12,2	12,8	3,7	5,0	1,5
nM	7,0	7,1	8,4	5,0	14,2	3,8
eM	4,2	4,4	4,9	2,6	4,5	1,0
bM	0,1	0,3	0,1	0,1	-	-
Mob	3,0	4,0	1,6	3,3	1,9	2,7
MM	24,1	17,6	30,6	22,5	43,7	48,7
St	7,9	7,0	2,5	1,7	1,5	5,4
nS	29,7	38,2	30,6	53,6	19,0	30,4
eS	5,1	6,5	6,0	3,2	7,5	5,0
bS	-	0,1	-	-	-	-
Moz	1,7	1,8	1,9	4,0	2,5	1,4
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Mitosen

	M _K	M _Z		M _K	M _Z
rMI	1	1	wMI	4	5
24h	103	55	48h	610	581
wMI	6	6	rMI	1	3
24h	785	756	72h	32	137
rMI	1	1	wMI	1	2
48h	87	34	72h	766	531

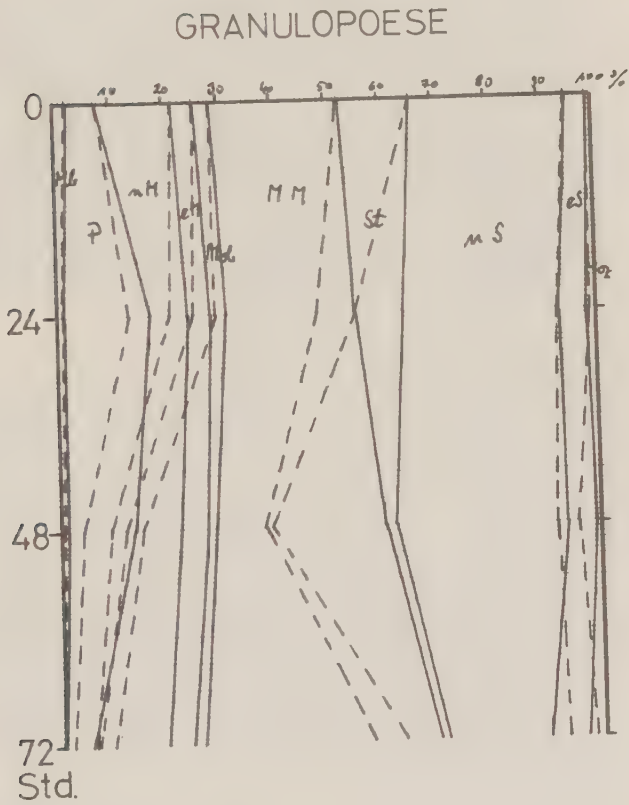
M_K=Mitosen in Kontrollkultur; M_Z=Mitosen in Zusatzkultur

Abb. 3 a (Reifungskurven, Marie H.)



Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

Abb. 3 b (Reifungskurven, Marie H.)



Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

Fall IV: wenig angeregte Erythropoese

Tab.4, Abb.4

1. Reifungskurve der Erythropoese:

Nach 24 und 48 Stunden verschieben sich die Kurven nach Einwirkung von Zytosin-Arabinosid nach links. Das bedeutet eine prozentuale Abnahme der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten und eine Zunahme der reifen Erythroblasten. In der 72-Stunden-Kultur nehmen die polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten relativ ab und die reifen Erythroblasten zu. Nach 96 Stunden zeigt sich wieder eine Abnahme der unreifen Zellen, eine Zunahme der oxyphilen und wiederum eine relative Abnahme der reifen Erythroblasten (die Kontrolle hat fast nur noch reife Erythroblasten).

2. Reifungskurve der Granulopoese:

Nach 24 und 48 Stunden Bebrütung mit Zytosin-Arabinosid ist lediglich eine Verminderung der Promyelozyten und ein starker prozentualer Anstieg der Stab- und Segmentkernigen erkennbar. In der 72-Stunden-Kultur zeichnet sich eine relative Abnahme der Promyelozyten und Myelozyten, auch der Stabkernigen, aber ebenfalls eine Abnahme der Segmentkernigen ab. Die 96-Stunden-Kultur zeigt eine starke prozentuale Verminderung der Promyelozyten, aber eine Vermehrung der Myelozyten und einen starken relativen Zuwachs der Metamyelozyten, weniger der stab- und segmentkernigen Granulozyten.

3. G/E-Indices: (s. Tab. 7, S. 46)

Der Anstieg des G/E-Index 24 Stunden nach Einwirkung von Zytosin-Arabinosid beweist eine stärkere Schädigung der Erythropoese, nach 48 bis 96 Stunden eine stärkere Depression der Granulopoese.

4. Mitosen: (s. Tab. 8, S. 47)

Die Mitoseindices steigen insgesamt, lediglich der rote Mitoseindex fällt nach 96 Stunden.

5. Signifikanzberechnung der Werte für die Reifungskurven: siehe Tab.9.

Tabelle 4 (Pat. B., Elise)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	24 h		48 h		72 h		96 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Pb	2,4	1,6	0,8	1,0	0,2	0,3	0,3	0,1
bE	6,5	3,6	2,7	1,7	0,5	0,9	0,8	0,5
pE	31,2	32,0	11,0	3,8	7,8	2,3	1,2	0,6
oE	2,8	2,1	10,1	7,7	18,4	8,2	0,4	13,8
rE	57,1	60,7	75,4	85,8	73,1	88,3	97,3	85,0
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

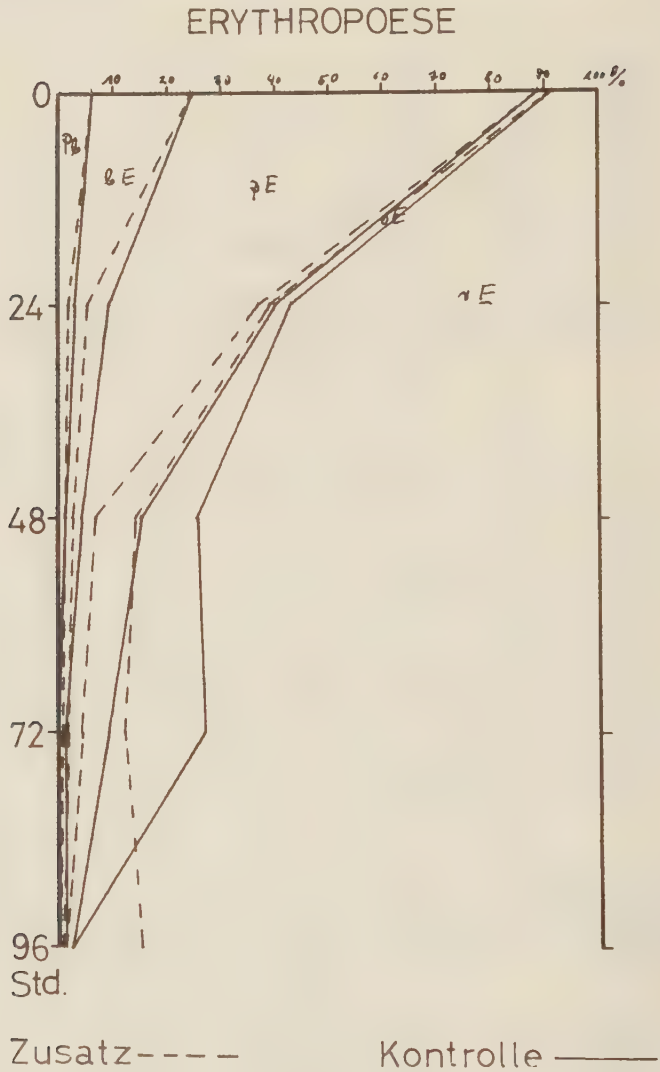
	24 h		48 h		72 h		96 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Mb	1,7	2,2	1,0	1,6	0,7	1,1	0,2	0,5
P	22,6	19,6	21,6	11,2	9,6	4,4	9,0	2,1
nM	20,7	21,0	18,2	18,9	13,0	12,9	11,8	15,4
eM	6,6	6,6	8,4	9,0	8,3	7,8	6,6	2,3
bM	0,2	0,2	-	0,5	-	-	0,1	-
Mob	1,8	2,3	2,3	1,4	1,1	1,7	0,6	0,3
MM	31,7	24,7	30,2	25,7	27,1	28,5	38,3	37,7
St	5,6	8,6	3,6	12,8	8,3	14,2	6,1	9,2
nS	5,4	9,6	10,9	13,6	25,4	24,7	22,8	25,6
eS	3,2	3,6	2,4	4,5	6,1	4,5	3,9	6,9
bS	-	-	-	0,1	-	-	-	-
Moz	0,5	1,6	1,4	0,7	0,4	0,2	0,6	-
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Mitosen:

	M _K	M _Z		M _K	M _Z
rMI	3	5	rMI	1	1
24h	406	276	72h	257	137
wMI	5	7	wMI	3	4
24h	848	1007	72h	491	461
rMI	1	2	rMI	1	1
48h	91	150	96h	21	212
wMI	5	8	wMI	3	2
48h	571	608	96h	595	390

M_K=Mitosen in Kontrollkultur; M_Z=Mitosen in Zusatzkultur

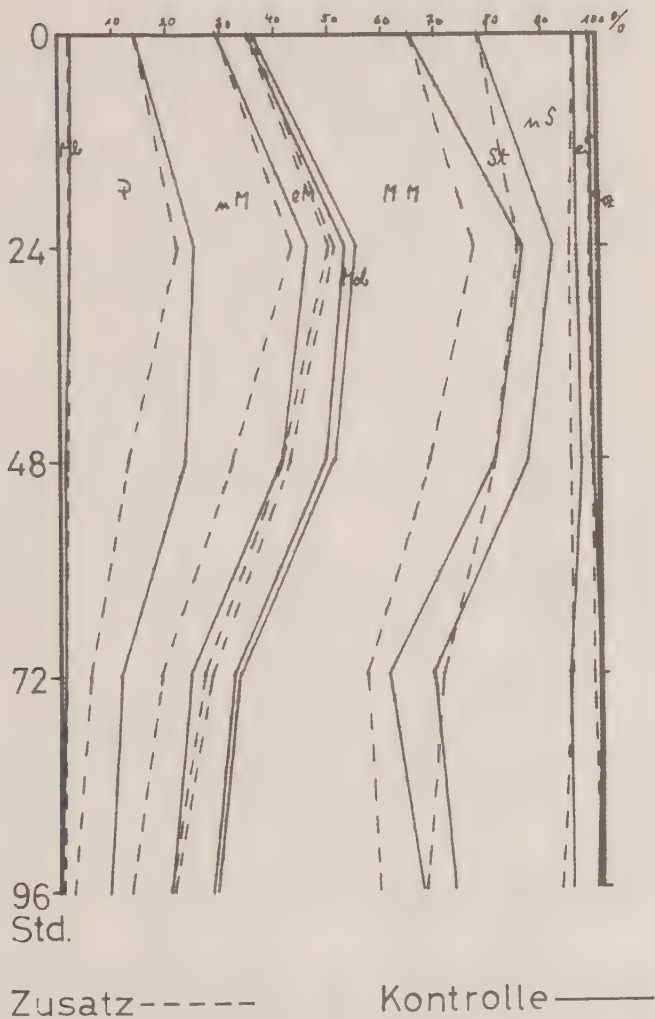
Abb. 4 a (Reifungskurven, Elise B.)



Zeichenerklärung: siehe Abb. 4 a und b

Tabelle 4 b (Reifungskurven, Elise B.)

GRANULOPOESE



Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

Fall V: beginnende chron. myeloische Leukämie Tab.5, Abb.5

1. Reifungskurve der Erythropoese:

In der 24-Stunden-Kultur ist nach Zusatz von Zytosin-Arabinosid eine relative Abnahme der unreifen Zellen, aber auch eine geringe relative Verminderung der reifen Erythroblasten auffällig. Lediglich der Prozentsatz der polychromatischen Erythroblasten steigt etwas. Nach 48 Stunden zeigt sich eine Abnahme der unreifen Zellen, während die reifen Erythroblasten prozentual stark zunehmen. Auch die 72-Stunden-Kultur läßt noch eine starke Verminderung der basophilen und polychromatischen Erythroblasten und eine Vermehrung der reifen Erythroblasten erkennen.

2. Reifungskurve der Granulopoese:

24 Stunden nach Einwirkung von Zytosin-Arabinosid ist die Verschiebung der Kurve nach rechts zugunsten der Myeloblasten und besonders der Promyelozyten signifikant. Dabei werden die segmentkernigen Granulozyten besonders stark prozentual vermindert. Die 48-Stunden-Kultur zeigt nach Zusatz von Zytosin-Arabinosid eine enorme relative Zunahme der Segmentkernigen, während die 72-Stunden-Kultur wieder der Verteilung der 24-Stunden-Kultur gleicht.

3. G/E-Indices: (s. Tab. 7, S. 46)

Nach 24 und 48 Stunden Bebrütung mit Zytosin-Arabinosid ist eine starke Schädigung der Erythropoese auffällig, während nach 72 Stunden die Depression der Granulopoese erkennbar ist. Die starken Schwankungen der G/E-Indices sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Knochenmarkproben bei der beginnenden Leukämie zurückzuführen.

4. Mitosen: (s. Tab. 8, S. 47)

Die Mitoseindices der roten Reihe sinken nach Zusatz des Zytostatikums in der 24- und 48-Stunden-Kultur auf 0, nach 72 Stunden sind in beiden Kulturen keine Mitosen gesehen worden. Der weiße Mitoseindex zeigt 24 Stunden nach Einwirkung von Zytosin-Arabinosid einen Anstieg, nach 48 Stunden einen Abfall und nach 72 Stunden wiederum einen Anstieg.

Tabelle 5 (Pat.N., Hilde)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Pb	2,0	1,5	0,2	-	-	-
bE	2,0	-	0,2	-	1,4	0,4
pE	58,3	64,7	54,5	14,7	4,2	3,0
oE	1,0	-	17,7	4,2	2,8	0,6
rE	36,7	33,8	27,4	81,1	91,6	96,0
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

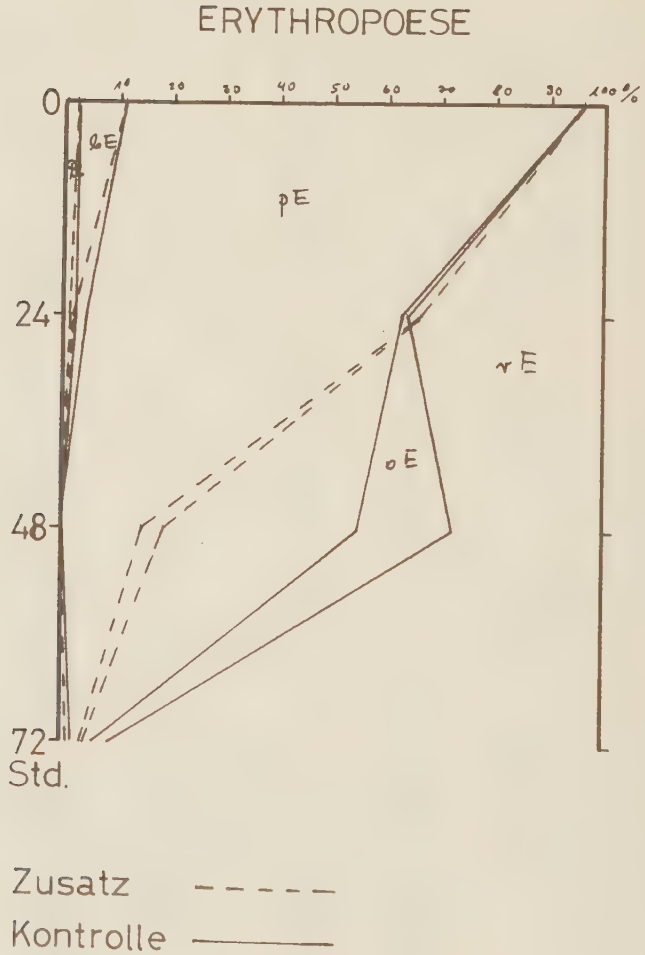
	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Mb	2,6	4,6	3,2	1,4	4,3	0,5
P	12,6	38,7	18,9	3,1	7,2	4,4
nM	11,6	6,7	16,6	2,1	25,7	13,0
eM	6,3	7,5	10,4	3,4	8,9	4,1
bM	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Mob	0,4	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1
MM	15,6	24,4	24,8	14,7	33,3	40,2
St	1,2	2,0	1,5	1,7	0,6	2,2
nS	44,6	10,8	18,0	68,4	14,6	32,2
eS	3,6	4,2	5,6	3,3	4,5	2,2
bS	0,1	0,1	0,1	-	-	-
Moz	1,4	0,8	0,7	1,4	0,6	1,0
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Mitosen:

	M _K	M _Z		M _K	M _Z
rMI			wMI		
24h	$\frac{2}{192}$	$\frac{0}{43}$	48h	$\frac{4}{622}$	$\frac{2}{474}$
wMI			rMI		
24h	$\frac{2}{752}$	$\frac{8}{1492}$	72h	$\frac{0}{12}$	$\frac{0}{19}$
rMI			wMI		
48h	$\frac{1}{300}$	$\frac{0}{18}$	72h	$\frac{0}{1160}$	$\frac{1}{648}$

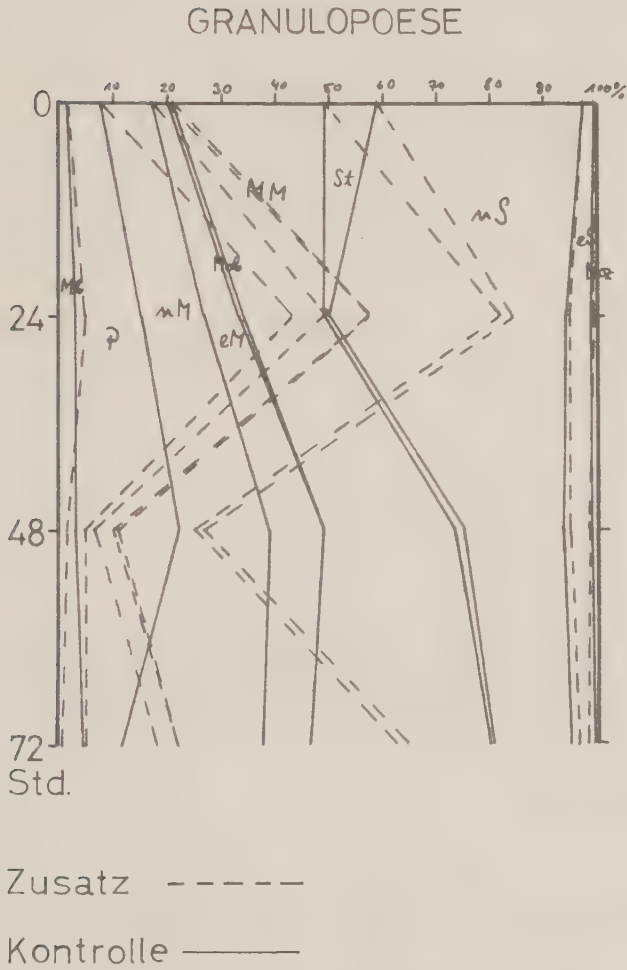
M_K=Mitosen in Kontrollkultur; M_Z=Mitosen in Zusatzkultur

Abb. 5 a (Reifungskurven, Hilde N.)



Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

Abb. 59 (Reifungskurven, Hilde N.)



Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

Zusammenstellung der Ergebnisse:

Bei Zusatz von 20 μ g/ml Zytosin-Arabinosid zu Knochenmark-Kulturen von 5 Patienten mit unterschiedlichen Knochenmark-Befunden stellte sich heraus, daß die Wirkung dieser zytostatischen Substanz, unabhängig von der jeweiligen Diagnose, einen einheitlichen Effekt auf die Proliferation der Knochenmarkszellen zeigt. Es ergibt sich also kein Unterschied zwischen der Reaktion von gesundem, reaktiven Knochenmark und Knochenmark bei chronischer myeloischer Leukämie.

Bereits ohne Zusatz des Zytostatikums besteht allerdings bei chronischen myeloischen Leukämien (Pat. H.N.) eine von der normalen Granulopoese abweichende Proliferationskinetik (4).

Da sich bei 4 Patienten (Fälle 1-4) übereinstimmende, nur wenig von der Norm abweichende Knochenmark-Zusammensetzungen fanden, ergab sich die Möglichkeit, die vorliegenden Werte arithmetrisch zu mitteln. Mit dieser Mittelwertberechnung läßt sich unsere Untersuchung auf ein Gesamtergebnis für annähernd normales Knochenmark zusammenfassen.

Die arithmetrischen Mittelwerte ergaben: Tab.6, Abb.6

1. Reifungskurve der Erythropoese:

24 Stunden nach Einwirkung von Zytosin-Arabinosid wird eine relative Abnahme der Zahl der Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten deutlich, während sich die reifen Erythroblasten prozentual vermehren. Derselbe Effekt zeigt sich auch in der 48-Stunden-Kultur. Nach 72 Stunden fällt bei Zusatz von Zytosin-Arabinosid eine Verschiebung der Kurven nach rechts auf. Das bedeutet eine relative Vermehrung der basophilen bis oxyphilen Erythroblasten und eine relative Verminderung der reifen Erythroblasten. Dieser Verlauf ist sicherlich auf die nachlassende Wirkung des Zytostatikums zurückzuführen, das anfangs die Reifung der Erythropoese gefördert hat.

2. Reifungskurve der Granulopoese:

Nach 24 Stunden Einwirkungszeit von Zytosin-Arabinosid ist eine auffallende Verschiebung der Kurven nach links

zu erkennen. Die Zahl der Promyelozyten und Myelozyten nimmt prozentual ab und die der stab- und segmentkernigen Granulozyten stark zu. Es fehlt also die anfängliche Verminderung der Segmentkernigen und die relative Zunahme der teilungsfähigen Zellen. Nach einer Einwirkungszeit von 48 Stunden mit Zytosin-Arabinosid ist die Entwicklung noch ausgeprägter. Die Segmentkernigen nehmen prozentual noch deutlicher zu. Die 72-Stunden-Kultur zeigt wie bei der Erythropoese einen Wirkungsverlust der Substanz. Lediglich die Zahl der Promyelozyten ist noch nach Zusatz von Zytosin-Arabinosid gering vermindert, während der Prozentsatz der Segmentkernigen sich nicht mehr vermehrt.

3. G/E-Indices der arithmetrisch gemittelten Fälle 1 - 4:
Tab. 7

Der G/E-Index zeigt nach 24 und 48 Stunden Bebrütung mit dem Zytostatikum eine stärkere Depression der Erythropoese, erst nach 72 Stunden eine deutlichere Schädigung der Granulopoese.

4. Mitosen der arithmetrisch gemittelten Fälle 1 - 4:
Tab. 6, Tab. 8

Die Mitosenzahl von Erythropoese und Granulopoese steigt bei Zusatz von 20 µg/ml Zytosin-Arabinosid insgesamt von 89 auf 120 Mitosen an. Dabei nehmen Mitoseindex der Erythro- und Granulopoese in allen Kulturen zu. Außerdem zeigt sich, daß der rote Mitoseindex nach 24 und 48 Stunden Einwirkung stärker zunimmt als der weiße. Nach 72 Stunden fällt die prozentual größere Mitosehäufigkeit der Granulopoese auf.

5. Karyologische Kurven der arithmetrisch gemittelten
Fälle 1 - 4: Abb. 7

Die karyologischen Kurven verdeutlichen in der Erythro- und Granulopoese eine starke Zunahme der Pro- und frühen Metaphase und eine geringe Abnahme der späten Metaphase. Das bedeutet entweder eine Verlängerung der Pro- und frühen Metaphase durch das Zytostatikum, also eine Hemmung des Mitoseablaufes oder eine Beendigung der Mitose während der Metaphase, sog. offene Endomitosen (4, 5).

Die Anaphase zeigt in der roten und weißen Reihe eine relative Zunahme, während die Telophase in der Erythropoese eine Zunahme und in der Granulopoese eine Abnahme aufweist:

absolute Mitosezahlen:

in Erythropoese			in Granulopoese		
K = 4	Z = 10	Prophase	K = 11	Z = 14	
K = 8	Z = 14	frühe Metapn.	K = 14	Z = 28	
K = 13	Z = 11	späte Metaph.	K = 20	Z = 27	
K = 1	Z = 3	Anaphase	K = 7	Z = 8	
K = 1	Z = 2	Telophase	K = 4	Z = 3	
K = 0	Z = 0	Rekonstr. ph.	K = 0	Z = 0	
27	40		62	80	

Tabelle 6 (arithmetrische Mittelwerte der Patienten:
G.,Dieter, K.,Julius, H.,Marie, B.,Elise)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Pb	2,8	2,5	1,4	0,8	0,1	0,3
bE	6,0	3,5	3,0	2,4	1,1	1,4
pE	29,3	22,1	14,1	8,8	7,3	13,4
oE	3,3	3,0	7,5	9,5	8,2	11,2
rE	58,6	68,9	74,0	78,2	83,3	73,7
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

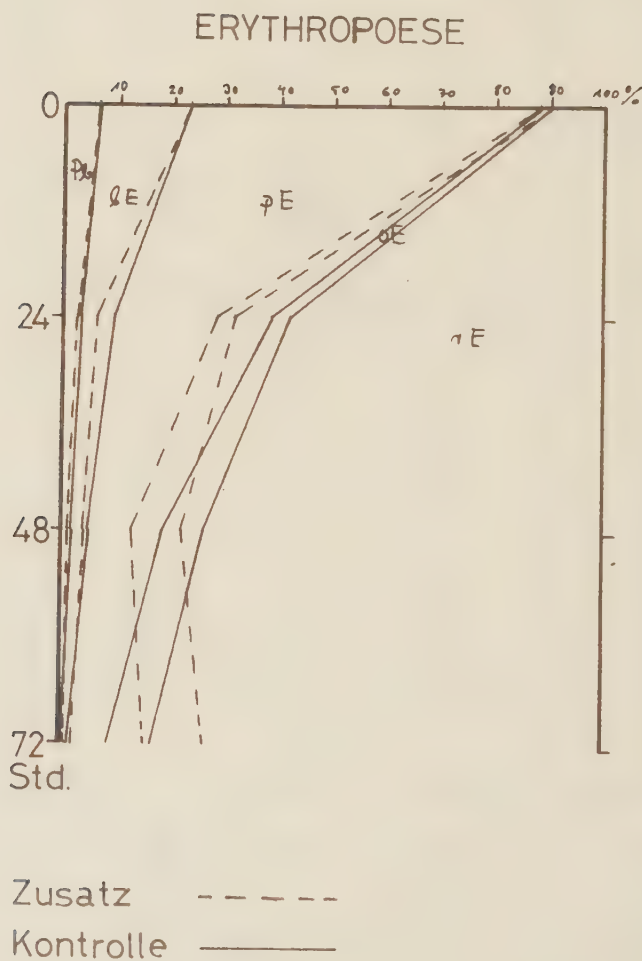
	24 h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Mb	1,7	2,0	1,3	1,0	0,6	0,6
P	23,6	13,2	14,4	5,9	5,7	4,5
nM	23,1	21,6	20,0	14,0	18,0	20,0
eM	3,7	3,9	4,4	3,6	4,1	4,3
Mob	1,6	2,1	1,6	1,4	0,9	1,3
nM	23,6	22,0	29,7	21,6	33,0	32,9
St	4,6	6,6	3,2	8,0	4,8	5,9
nS	14,4	22,2	21,0	40,3	26,6	26,7
eS	2,0	3,6	2,8	2,6	5,1	2,7
Moz	1,1	1,8	1,3	1,6	1,2	1,1
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Mitosen:

	M _K (%)	M _Z (%)		M _K (%)	M _Z (%)
rMI 24h	11,9	21,1	wMI 48h	7,4	15,6
rMI 24h	8,9	10,3	rMI 72h	19,3	24,1
rMI 48h	13,4	24,5	wMI 72h	3,7	7,8

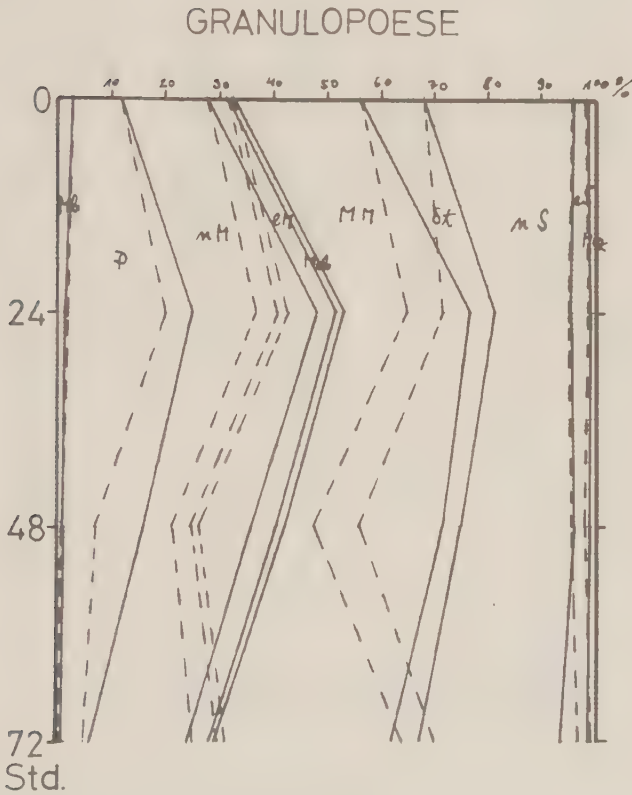
M_K=Mitosen in Kontrollkultur; M_Z=Mitosen in Zusatzkultur

Abb. 6 a (Reifungskurven, mittlere)



Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

Abb. 6 o (Reifungskurven, mittlere)



Zusatz - - - - -

Kontrolle —————

Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b Zeichenerklärung: siehe Abb. 1 a und b

Tabelle 7

G/E-Indices

Kontrolle:

Std.	D.G.	J.K.	M.H.	E.B.	Mittel	H.N. ^{+))}
0	3,6	2,4	3,0	2,8	3,0	11,0
24	2,9	1,3	3,5	1,1	2,2	5,0
48	1,6	2,1	1,8	2,0	1,9	2,0
72	2,7	0,6	2,1	0,9	1,6	10,2
96				1,1		

Zusatz:

Std.	D.G.	J.K.	M.H.	E.B.	Mittel	H.N. ^{+))}
24	2,7	1,4	6,4	1,9	3,1	28,0
48	2,2	1,3	6,9	0,9	2,8	19,9
72	2,1	0,7	1,5	0,7	1,3	2,2
96				0,3		

^{+))} chronische myeloische Leukämie

Tabelle 8

Mitose-Indices (in %) -----

ERYTHROPOESE

Kontrolle:

Std.	D.G.	J.K.	M.H.	E.B.	Mittel	H.N. ⁺⁾
0	9,3	20,6	7,5	9,5	11,7	23,4
24	9,9	20,6	9,7	7,4	11,9	10,4
48	10,6	20,6	11,4	11,0	13,4	3,3
72	38,5	3,8	31,2	3,9	19,3	0
96				47,6		

Zusatz von Zytosin-Arabinosid:

Std.	D.G.	J.K.	M.H.	E.B.	Mittel	H.N. ⁺⁾
24	21,9	26,2	18,2	18,1	21,1	0
48	29,8	25,1	29,5	13,4	24,5	0
72	60,5	6,7	21,9	7,3	24,1	0
96				4,7		

GRANULOPOESE

Kontrolle:

Std.	D.G.	J.K.	M.H.	E.B.	Mittel	H.N. ⁺⁾
0	7,3	17,2	7,4	7,6	9,9	8,4
24	9,7	12,4	7,6	5,9	8,9	2,6
48	8,6	5,8	6,5	8,8	7,4	6,4
72	3,3	4,1	1,3	6,1	3,7	0
96				5,0		

Zusatz von Zytosin-Arabinosid:

Std.	D.G.	J.K.	M.H.	E.B.	Mittel	H.N. ⁺⁾
24	10,7	15,6	7,9	6,9	10,3	5,4
48	21,6	18,8	8,6	13,2	15,6	4,2
72	11,4	7,2	3,8	8,7	7,8	1,5
96				5,1		

⁺⁾ chronische myeloische Leukämie

Abb. 7 a (Mitosenverteilung, absolute)
s. Text S. 41

ERYTHROPOESE



Zusatz -----

Kontrolle -----

Abszisse: Mitosephasen

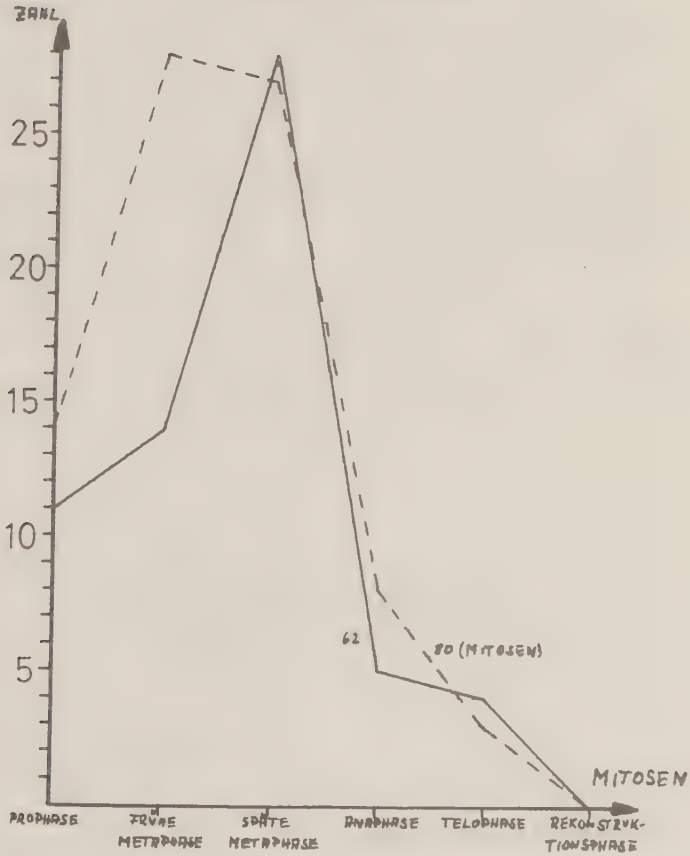
Ordinate: absolute Mitosezahl

Abb. 7 b

(Mitosenverteilung, absolute)

vs. Text . . .

GRANULOPOESE



Zusatz - - - -

Kontrolle ———

Abszisse: Mitosephasen

Ordinate: absolute Mitosezahl

6. Signifikanzberechnung

Die statistische Berechnung der Ergebnisse war nur für die Patientin E.B. erforderlich. Es konnte nämlich aus dem Bild der prozentualen Reifungskurven gefolgert werden, daß bei Zusatz des Zytostatikums Kurven mit der geringsten Abweichung (im Vergleich zu den Reifungskurven der anderen Patienten) von den Kontrollkurven auch die niedrigst signifikanten Werte und Kurven mit stärkerer Abweichung auch höher signifikante Werte ergeben müßten.

Dabei hat sich folgendes ergeben (für Patientin E.B.): In der Erythropoese war nach einer Einwirkungszeit von 24 Stunden bei Vergleich der Kontroll- mit den Zusatzkurven kein signifikantes Resultat festzustellen. Währenddessen wurden für die 48-, 72- und 96-Stunden-Kulturen hoch-signifikante Abweichungen errechnet.

Die Granulopoese zeigte insgesamt ähnlich hoch-signifikante Resultate wie die Erythropoese. Es waren auch hier nach allen Bebrütungszeiten die Abweichungen zwischen Kontroll- und Zusatzkurven hoch-signifikant.

Die Berechnung der 96-Stunden-Kulturen ist mit Vorsicht zu beurteilen, da infolge des vermehrten Zelldetritus Fehler bei der Zelldifferenzierung leichter auftreten konnten als nach kürzeren Bebrütungszeiten (Tab.9).

Es wird also aus den Reifungskurven der übrigen 4 Patienten geschlossen, daß die Abweichungen zwischen Kontroll- und Zusatzkurven ebenfalls hoch-signifikant sind.

Außerdem wurde die Signifikanz für die Mitosen berechnet. Dabei wurden die Summen der Mitosen (der 4 Patienten G., K., H., B) von Kontrolle und Zusatz zu den jeweiligen Bebrütungszeiten (24, 48 und 72 Stunden) miteinander verglichen, - gesondert für Erythro- und Granulopoese.

Das Ergebnis war folgendes: (in χ^2 -Werten)

	in Erythropoese		in Granulopoese
nach 24 ^h :	$\chi^2=2,39$ (nicht signif.)	$\chi^2=0,24$ (nicht signif.)	
48 ^h :	$\chi^2=1,21$ " "	$\chi^2=6,69$ (signifikant!)	
72 ^h :	$\chi^2=0,81$ " "	$\chi^2=2,33$ (nicht signif.)	

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die Mitosen von Kontrolle und Zusatz lediglich in der Granulopoese nach 48 Stunden Bebrütung mit Zytosin-Arabinosid signifikant vermehrt haben. (Beispiel zur Berechnung der Signifikanz der Mitosen s.u.)

Die Anwendung des χ^2 -Testes für die Signifikanzberechnung der Mitosen erfolgte nach folgendem Schema:

Das Beispiel zeigt die Berechnung der Originalwerte der 24^h -Kulturen in der Erythropoese.

Kontrolle: 14 Mitosen von 1114 teilungsfähigen Zellen

Zusatz: 17 Mitosen von 782 teilungsfähigen Zellen

B_M = Beobachtungswert der Mitosen

B_N = Beobachtungswert der Nicht-Mitosen (d.h. Ruhezellen)

B_{M+N} = Beobachtungswert der Mitosen + Nicht-Mitosen

E_M = Erwartungswert der Mitosen

E_N = Erwartungswert der Nicht-Mitosen.

Berechnung von E_M :

$$E_M = \frac{\text{Summe der Mitosen (von Kontrolle u. Zusatz)}}{\text{Summe der Gesamtzahlen}} \times \text{Summe der Beobachtungswerte } (B_{M+N})$$

Berechnung von E_N :

$$E_N = B_{M+N} - E_M$$

$$\text{Kontrolle: } E_M = \frac{31}{1896} \times 1114 = 18,2$$

$$E_N = 1114 - 18,2 = 1095,8$$

$$\text{Zusatz : } E_M = \frac{31}{1896} \times 782 = 12,8$$

$$E_N = 782 - 12,8 = 769,2$$

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontrolle	14	1100	1114	18,2	1095,8
Zusatz	17	765	782	12,8	769,2
Summe	31	1865	1896	31,0	1865,0

Berechnung des χ^2 :

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

Kontrolle:		$(B - E)^2$	$(B - E)^2/E$
$B_M - E_M$	$= 4,2$	17,6	0,970
$B_N - E_N$	$= 4,2$	17,6	0,016

Zusatz:

$B_M - E_M$	$= 4,2$	17,6	1,380
$B_N - E_N$	$= 4,2$	17,6	0,023

$$\chi^2 = 2,389$$

Freiheitsgrad = 1

das Ergebnis ist nicht signifikant.

Tabelle 9

Werte der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven der Erythropoese (Patientin E.B.):

	24 h		48 h		72 h		96 h	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
Pb	0,64	0,68	0,00	0,04	0,02	0,02	0,19	0,06
bE	2,76	3,73	0,70	0,37	0,41	0,38	0,36	0,17
pE	0,02	0,03	17,94	6,30	19,11	14,76	1,40	0,74
oE	0,26	0,36	1,68	0,59	23,86	18,76	65,11	38,67
rE	0,40	0,54	2,68	0,94	8,15	7,24	6,47	25,76
	4,08	5,50	23,00	8,24	51,55	41,16	73,53	65,40
nach 24 h:	$\chi^2 = 9,58$		d.h. nicht signifikant					
nach 48 h:	$\chi^2 = 31,24$		d.h. hoch-signifikant					
nach 72 h:	$\chi^2 = 92,71$		d.h. hoch-signifikant					
nach 96 h:	$\chi^2 = 138,93$		d.h. hoch-signifikant					

Werte der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven der Granulopoese (Patientin E.B.):

	24 h		48 h		72 h		96 h	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
Mb	0,39	0,32	0,54	0,47	0,13	0,15	0,03	0,07
P	1,59	1,07	15,26	11,58	8,70	8,57	6,00	13,33
nM	0,01	0,02	0,06	0,09	0,02	0,01	0,74	1,68
eM	0,01	0,00	0,08	0,09	0,09	0,06	2,94	6,55
bM	0,01	0,01	0,89	0,75	-	-	0,06	0,12
Mob	0,54	0,27	0,83	0,60	0,55	0,58	0,02	0,06
MM	5,33	3,75	1,38	0,92	0,27	0,37	0,01	0,00
St	3,83	3,02	21,03	17,04	6,01	6,38	0,93	2,57
nS	7,10	5,51	1,33	1,16	0,11	0,06	0,19	0,59
eS	0,11	0,10	2,61	2,15	1,10	1,02	1,32	3,16
bS	-	-	0,02	0,00	-	-	-	-
Moz	3,73	2,72	0,84	0,66	0,00	0,06	0,31	0,68
	22,04	16,79	44,87	35,51	16,98	17,20	12,55	28,81
nach 24 h:	$\chi^2 = 38,88$		d.h. hoch-signifikant					
nach 48 h:	$\chi^2 = 80,38$		d.h. hoch-signifikant					
nach 72 h:	$\chi^2 = 34,18$		d.h. hoch-signifikant					
nach 96 h:	$\chi^2 = 41,36$		d.h. hoch-signifikant					

Die Ergebnisse des 5. Patienten (N.) mit der Diagnose einer chronischen myeloischen Leukämie wichen schon ohne Zusatz von Zytosin-Arabinosid von denen der anderen Patienten ab (4): Tab. 5, Abb. 5.

Die Reifungskurve der Erythropoese zeigt 24 Stunden nach Zusatz des Zytostatikums eine Verringerung des Prozentsatzes der unreifen und reifen Zellen, lediglich bei den polychromatischen Erythroblasten steigt er an. Die 48- und 72-Stunden-Kulturen lassen eine starke Vermehrung der reifen Erythroblasten erkennen.

Deutlicher wird das unterschiedliche Verhalten zu den anderen 4 Fällen in der Reifungskurve der Granulopoese. Hier ist insbesondere in der 24- und 72-Stunden-Kultur nach Zusatz ein enormer Anstieg der Promyelozyten-Prozentzahlen zu verzeichnen, während die segmentkernigen Granulozyten stark vermindert sind.

Aus dem G/E-Index der 24- und 48-Stunden-Kulturen ergibt sich eine wesentlich stärkere Hemmung der Erythropoese als bei den Fällen mit normaler Proliferationskinetik (G., K., H., B.). Nach 72 Stunden Einwirkung von Zytosin-Arabinosid steht eine starke Schädigung der Granulopoese im Vordergrund (Tab. 7).

Die Mitosenzahl von Erythro- und Granulopoese steigt - ebenso wie bei den Fällen 1-4 - nach Zugabe des Zytostatikums von insgesamt 9 auf 11 Mitosen an (Tab. 5). Dabei sinkt aber der rote Mitoseindex nach 24 und 48 Stunden, während der weiße nach 24 und 72 Stunden höher und lediglich nach 48 Stunden Einwirkung niedriger als die Kontrolle ist (Tab. 8).

Wegen der differierenden Proliferationskinetik bei chronischer myeloischer Leukämie von der der anderen 4 Fälle wurden diese Werte nicht in die vorangegangene Mittelwert-Berechnung einbezogen.

Diskussion:

Zielsetzung dieser Untersuchung war es, den Einfluß von Zytosin-Arabinosid auf die Proliferation von menschlichem Knochenmark in vitro festzustellen. Dabei sollte auch geklärt werden, ob leukämisches und nicht-leukämisches Knochenmark unterschiedlich auf das Zytostatikum reagieren.

Die Ergebnisse zeigen, daß Zytosin-Arabinosid bei den 5 untersuchten Knochenmark-Protien einen hoch-signifikanten Effekt auf die Proliferation der Knochenmarkzellen in der Erythro- und Granulopoese erzielt hat.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von KIM und BREHAUT an HeLa-Zellen und stimulierten Lymphozyten (7, 17), bei denen Konzentrationen von $8,2 \times 10^{-6}$ M bis 5×10^{-9} M verwendet wurden (unsere Konzentrationen lagen bei 8×10^{-5} M), und die eine Verminderung des Mitoseindex ergaben, war bei uns durch Einwirkung von Zytosin-Arabinosid am menschlichen Knochenmark eine Erhöhung des roten und weißen Mitoseindex auffällig: In der Granulopoese zeigte sich ein deutlicher Unterschied zum Kontroll-Versuch bis zur 72-Stunden-Kultur, in der Erythropoese lediglich bis zur 48-Stunden-Kultur (Tab.8). Dabei muß erwähnt werden, daß bei den oben genannten Untersuchungen von KIM und BREHAUT die Verringerung der Mitosenäufigkeit nach Zugabe von Zytosin-Arabinosid mit H^3 -Thymidin-Markierung der Zellen gemessen wurde. Die Ergebnisse dieser Methode widersprechen also den hier in vitro ausgewerteten Mitose-Indices. Auf menschliche Knochenmarkzellen wurde bisher weder mit Markierungsversuchen noch durch Zählen der Mitosen die Wirkung von Zytosin-Arabinosid untersucht.

Es bieten sich für die in unseren Versuchen gefundene Erhöhung des Mitoseindex folgende zwei Erklärungsmöglichkeiten an:

1. Nach SILAGI kann es zum Einbau von Zytosin-Arabinosid in die DNS (27) und infolgedessen zur Blockierung weiterer Polymerisierung der DNS kommen (19). Die dadurch in der Zelle gebildete, "unphysiologische" DNS (an der

Stelle des Desoxycytidintriphosphates ist Zytosin-Arabinosid eingebaut) kann zwar nicht den Mitoseablauf verhindern, doch sind die entstehenden Tochterzellen mit der pathologischen DNS infolge des "unbalancierten" Wachstums (15, 19) nicht lange lebens- und fortpflanzungsfähig. Der Einbau von Zytosin-Arabinosid kann aber auch zur Mitosearretierung in der Pro- und frühen Metaphase führen (BOLL), die vielleicht besonders "vulnerable" Phasen des Zellzyklus darstellen (19), - entsprechend dem Verlauf der karyologischen Kurven (Abb. 7).

2. Außerdem kann es nach der Pro- bzw. frühen Metaphase zu sog. offenen Endomitosen kommen oder wie in der Erythropoese zur Bildung von tetraploiden Riesenkernen oder Megaloblasten führen (15, 25, 31), wodurch die Zellvermehrung nach der Mitose entfällt. Durch diesen Mechanismus würde die vermehrte Zeldestruktion und Zelldegeneration in den mit Zytosin-Arabinosid bebrüteten Kulturen erklärt werden (Kernpyknosen und Vakuolisierung): Die unreifen Zellen nehmen prozentual ab und die reifen Zellen zu, - wie unsere Reifungskurven auch aufzeigen. Die hierdurch auftretende Verschiebung der Kurven nach links wird nach BOLL als Reifungsförderung gedeutet, müßte aber in diesem Zusammenhang als fehlende Zellmultiplikation durch offene Endomitosen aufgefaßt werden.

Nach Zusatz von Zytosin-Arabinosid ist die Depression der roten Reihe anhand des G/E-Index anfangs (d.h. nach 24 und 48 Stunden Einwirkung) stärker nachweisbar als die der weißen Reihe (Tab. 7). Damit zeigt sich in dieser Untersuchung eine Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen klinischen Ergebnissen (31).

Nach Zusatz des Zytostatikums müßte die Verschiebung der Reifungskurven in der Erythropoese nach links, d.h. zugunsten der reifen Zellen, durch die fehlende Zellmultiplikation hervorgerufen worden sein. Dies hingegen wäre bei dem

erhöhten Mitoseindex nur bei offenen Endomitosen oder bei Verzögerung des Mitoseablaufes möglich (s.o.).

Die Verschiebung der Reifungskurven in der Granulopoese nach links kann verschieden gedeutet werden:

1. Die anfängliche Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten in vitro wird durch das Zytostatikum infolge der offenen Endomitosen oder infolge der Mitosearretierung verhindert, d.h. die Teilsynchronisation durch die Kultur entfällt (4). Die teilungsfähigen Zellen werden stärker geschädigt als die reifen Granulozyten, wodurch es zu einer scheinbaren Vermehrung der reifen Zellen kommt.

Nach 72 Stunden Bebrütung nimmt die Wirkung des Zytostatikums ab, - die teilungsfähigen Granuloblasten erholen sich und die scheinbare Ausreifung der Zellen läßt nach.

Zusammen mit der Erhöhung des Mitoseindex und dem Verlauf der karyologischen Kurven (d.h. Zunahme der Pro- und frühen Metaphase nach Zugabe von Zytosin-Arabinosid) spricht das für eine Schädigung der Zellregeneration.

2. Die Lebensdauer der segmentkernigen Granulozyten wird durch den Zusatz des Zytostatikums verlängert. Das ist allerdings nach den bisherigen Erfahrungen in der Biochemie sehr unwahrscheinlich, da der Einbau eines unphysiologischen "Bausteines" in die DNS schneller zum Zelltod führen muß. Diese Erklärungsmöglichkeit kann also vernachlässigt werden.

Übereinstimmend mit den Untersuchungen in vivo (23, 29) ließen sich auch durch Zusatz des Zytostatikums in vitro zellmorphologische Veränderungen verifizieren:

In der Erythropoese fand sich Karyorrhesis (u.a. "Gänseblümchen"-Kerne) als Zeichen eines gesteigerten Zellunterganges und häufig Megaloblasten. Die Granulopoese zeigte

abnorme Kernformen wie Kernabsprengungen, Kernausziehungen und Übersegmentierungen und im Protoplasma starke Vakuolisierung. Auffällig war insgesamt vermehrter Zelldetritus.

Bei der Knochenmark-Kultur der chronischen myeloischen Leukämie (Fall V) kam es in der Granulopoese wegen der veränderten Proliferationskinetik zu abweichenden Reifungskurven:

In der Kontroll-Kultur fehlte nach 24 Stunden die deutliche Vermehrung der teilungsfähigen Zellen als Ausdruck der Reifungsstörung bei dieser Erkrankung (BOLL).

Durch Zytosin-Arabinosid scheinen hier die in Kultur gesetzten pathologischen segmentkernigen Granulozyten infolge des Mitosegifteffektes stärker geschädigt oder/und die teilungsfähigen Zellen besonders vermehrt zu sein (Abb. 5 b). Nach 48 Stunden sind offensichtlich die durch Zytosin-Arabinosid geschädigten Zellen degeneriert. Hier fehlt die bei nicht-leukämischem Knochenmark festgestellte Erhöhung des Mitoseindex; er ist vielmehr zu allen Zeiten und in beiden haematopoetischen Reihen erniedrigt.

Womöglich reagieren die leukämischen Zellen empfindlicher auf das Zytostatikum als die nicht-leukämischen Zellen.

Auch bei der chronischen myeloischen Leukämie läßt nach 72 Stunden die Wirkung von Zytosin-Arabinosid nach.

Bei Lymphoblasten von akuten Leukämien fand CHAM ebenfalls einen stärkeren Effekt von Zytosin-Arabinosid als auf normale Knochenmarkszellen.

Hier sollten weitere Untersuchungen am Knochenmark akuter Leukämien angeschlossen werden.

Zusammenfassung:

Um die Wirkung des Zytostatikums Zytosin-Arabinosid auf die Proliferation von in vitro überlebenden Knochenmarkszellen festzustellen, wurde es 5 verschiedenen Knochenmark-Proben zugesetzt.

Bei 4 untersuchten Knochenmark-Proben handelte es sich in 2 Fällen um normales Knochenmark, in 2 weiteren Fällen um Knochenmark bei Anämie und im 5. Fall um ein Knochenmark im Beginn einer chronischen myeloischen Leukämie.

Es wurden Knochenmark-Kulturen mit Zusatz von 20 µg/ml Zytosin-Arabinosid und zur Kontrolle ohne Zusatz des Zytostatikums angesetzt.

Nach Differenzierung der verschiedenen Zellarten und Mitosephasen wurden zur Auswertung der Ergebnisse Reifungs- und karyologische Kurven angefertigt und Mitose- und G/E-Indices errechnet und auf Signifikanz untersucht.

In den 4 nicht-leukämischen Fällen ergab sich nach Zusatz von Zytosin-Arabinosid in der Erythro- wie in der Granulopoese ein deutlicher zytostatischer Effekt vom Typ des Mitosegiftes. Durch die Versuchsanordnung konnte allerdings nicht entschieden werden, ob die Mitosedauer während der Pro- und frühen Metaphase verlängert ist, ob es gehäuft zum Zelltod während der Mitose kommt oder ob offene Endomitosen die Ursache der Vermehrung früher Mitosephasen sind. Für die letzte Erklärung sprechen die auch in vivo gehäuft auftretenden hyperdiploiden Zellen mit Mehrkernigkeit.

Bei der chronischen myeloischen Leukämie war ein ähnlicher Effekt auf die Proliferation der Leukämiezellen festzustellen.

Literaturverzeichnis

1. BARANOW, L. von : Grundbegriffe moderner statistischer Methodik.
(Hirzel, Stuttgart 1950)
2. BELITZ, H.J. : Der Mathematikunterricht.
Sonderdruck Heft 3/60
(Klett, Stuttgart 1960)
3. BERNARD, J. : Un nouvel agent actif dans le traitement des leucémies aigues: la cytos.-arabinos.
Presse méd. 74, 799 (1966)
4. BOLL, I. : Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
(Springer, Bln. - Heidelberg - New York 1966)
5. BOLL, I. : Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulozytopoese.
Folia haemat. 91, 172 (1969)
6. BOLL, I. u.
G. MERSCH : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut 17, 193 (1968)
7. BREHAUT, L.A. u.
P.H. FITZGERALD : The Effects of Cyt.Arab. on the Cell Cycle of Cultured Human Leukocytes: A Microdensitometric and Autoradiographic Study.
Cell Tiss. Kinet. 1, 147 (1968)
8. BREHM, G. : Therapie mit Cyt.Arab. beim Melanom und Mycosis fungoides.
Arzneim.-Forsch. 19, 151 (1968)
9. ELLISON, R. u.
J.F. HOLLAND : Arabinosyl Cytosine: A Useful Agent in Treatment of Acute Leukemia in Adults.
Blood 32, 4: 507 (1968)
10. GERHARTZ, H. u.
R. AHMAD : Beeinflussung der Hämoopoese der Ratte durch Cyt.Arab.
Arzneim.-Forsch. 19, 52 (1968)

11. KILPATRICK, I. : Orale Behandlung mit Cyt.Arab.: Vorläufige klin. und tier-experimentelle Ergebnisse. Arzneim.-Forsch. 19, 153 (1963)
12. GOLDENBERG, D.M. u. S. WITTE : Wirkung von Cyt.Arab. bei Polycythemia vera. Arzneim.-Forsch. 19, 112 (1968)
13. HENDERSON, E.S., A.A. SERPICK, B.G. LEVENTHAL u. P.H. HENRY : Cyt.Arab. ein neues Antileukämikum. Med. Trib. 40, 17 (1968)
14. HOWARD, J.P., V. ALBO u. W.A. NEWTON : Cyt.Arab.: Results of a Cooperative Study in Acute Childhood Leukemia. Canc.Res. 21, 241 (1968)
15. KARA, J. u. H.H. WAELSCH : Induktion der Thymidinkinase und Desoxycythydin 5-mono-phosphat-Desaminase in den mit Cyt.Arab. behandelten Zellen. Arzneim.-Forsch. 19, 65 (1968)
16. KARLSON, P. : Kurzes Lehrbuch der Biochemie. (Thieme, Stuttgart 1967)
17. KIM, J.H. u. M.L. EIDINOFF : Action of Cyt.Arab. on the Nucleic Acid Metabolism and Viability of HeLa Cells. Canc.Res. 25, 698 (1965)
18. LAMPERT, F. : Cyt.Arab. zur Remissionseinleitung der akuten Leukämie im Kindesalter. 2. Aufl. (Urban + Schwarzenberg, München - Bln. - Wien 1972)
19. LANGEN, P. u. H. GRAETZ : Cell Death Resulting from Inhibition by 3'-deoxy-3'-fluorothymidin, Cytosin-arabinoside, 5-fluoro-2'-deoxyuridine and Hydroxyurea of DNA Synthesis in Cultured Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. Symposium Active Control of Nucleic Acid Metabolism. Abstr. S. 20 Schloß Reinhardsbrunn (Thüringen) May 1972

20. MITCHELL, M.S.,
M.E. WADE,
R.C. DECONTI,
J.R. BERTINO u.
P. CALABRESI : Immunosuppressive effects
of cyt.arab. and metho-
trexate in man.
Ann.int.Med. 70, 535 (1969)
21. MÜLLER - SEIFERT : Taschenbuch der medizinisch-
klinischen Diagnostik.
69. Aufl.
(Bergmann, München 1966)
22. FLÜSS, H.J. : 1-Arabinosylcytosin bei
akuter Myelose und lympho-
blastärer Leukämie wirksam.
Med.Trib. Heft 44 (1971)
23. STACHER, A. : Wirkung von Cyt.Arab. bei
akuten Leukämien.
Arzneim.-Forsch. 19, 126 (1968)
24. TALLEY, R.W. u.
V.K. VAITKEVICIUS : Megaloblastosis produced by
a cytosine antagonist
cyt.arab.
Blood 21, 352 (1963)
25. WILMANNS, W. : Molekularbiolog. und klin.
Wirkungen von Ara-C bei der
Therapie akuter Leukämien.
Arzneim.-Forsch. 19, 55 (1968)
26. WILMANNS, W. u.
J. HARTJE : Autoradiographische und
enzymchemische Untersuchungen
der DNS-Synthese in Leukämie-
zellen.
II.Thymidin-Kinase und H³-
Thymidin-Markierungsindex
unter cytostat. Therapie.
Klin.Wschr. 48, 788 (1970)
27. WILMANNS, W.,
K. MAINZER,
D. MÜLLER,
H. TALKE u.
H.H. HENNEKEUSER : Zur Behandlung akuter
Leukämien mit Cytosin-
Arabinosid.
Dtsch.med.Wschr. 52, 2509
(1968)
28. Wissenschaftliche
Tabellen : J.R. Geigy A.G.
Basel (1968)
29. WITTE, S. : Zytolog. Beobachtungen über
Cyt.Arab.-Effekte.
Arzneim.-Forsch. 19, 79 (1968)

30. WITTE, S. : Die Wirkung der Zytostatika auf die Erythropoese. In: A. Stacher: Chemo-Immunotherapie der Leukosen u. malignen Lymphome, S. 10. (Bohmann, Wien 1969)
31. WITTE, S. u. D.M. GOLDENBERG : Erste klin. Erfahrungen mit dem Antimetaboliten Cyt.Arab. bei der Chemotherapie von Hämoblastosen und verwandten Krankheiten. Med. Welt 18, 1838 (1967)
32. WITTE, S. u. H. RIEGG : Frage der Dauer der Wirkung von Cyt.Arab. bei Polycythämia vera. Arzneim.-Forsch. 19, 115 (1968)
33. ZAHN, R.K. : Wirkung des Cyt.Arab. auf die informationsgesteuerte Synthese. Arzneim.-Forsch. 19, 9 (1968)
34. ZAHN, R.K. : Wirkung des Cyt.Arab. auf die informationsgesteuerte Synthese. Arzneim.-Forsch. 19, 14 (1968)

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie
EURATOM - GSF, Nr. O31-64-1 BIAD.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungs-
gemeinschaft unterstützt.

Zum Schluß der Arbeit danke ich
Frau Professor Dr.med. Irene Boll
herzlich für die Überlassung des Themas
und die jederzeit hilfreiche Unterstützung.
Gleichzeitig gilt mein Dank Herrn
Professor Dr. H.J. Beelitz für die
Überprüfungen der Signifikanzberechnungen.

Lebenslauf

Am 11.12.1946 wurde ich, Klaus Christian Henry Mieske, als Sohn des Apothekers und früheren wissenschaftlichen Mitarbeiters bei den Farbenfabriken Bayer-Leverkusen, Dr. Hans Mieske, und seiner Ehefrau, Erika geb. Jesträm, von Beruf medizinisch-technische Assistentin, in Berlin geboren.

Nach regulärem Grundschulbesuch kam ich 1959 auf die Friedrich-Engels-Schule, Berlin-Reinickendorf. Dort bestand ich das Abitur im Frühjahr 1966.

Im SS 1966 wurde ich an der medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Nach 2 Semestern legte ich im März 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach weiteren 3 Semestern im Oktober 1968 die ärztliche Vorprüfung erfolgreich ab.

Dann immatrikulierte ich mich im WS 1969/70 an der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg und wechselte im SS 1970 wieder an die Freie Universität Berlin über. Im SS 1972 absolvierte ich mein medizinisches Staatsexamen.

